GE Healthcare

Biacore

Biacore Q

Instrument Handbook

日本語取扱説明書

GE imagination at work

31-3198-31

目次

1. セットアップ 1

1.1 電源およびソフトウェアの起動 1

1.1.1 電源の立ち上げおよび緩衝液の準備 1

1.1.2 コントロールソフトウェアの起動 2

1.2 システムの初期化 3

1.2.1 センサーチップの挿入（Dock） 3

1.2.2 ランニング緩衝液による平衡化（Prime） 4

1.2.3 ラックベースの設定 6

2. 基本操作（マニュアル操作） 8

2.1 サンプル、試薬類の添加 8

2.2 レスポンスの数値化 11

3. 濃度測定 14

3.1 固定化 15

3.1.1 固定化方法 15

3.1.2 プレコンセントレーションの検討（マニュアル操作） 17

3.1.3 IFC を用いた分子の固定化（Wizard 操作） 20

3.1.4 Surface Prep ユニットを用いた分子の固定化 29

3.2 濃度測定系構築のための条件検討 40

3.2.1 マニュアル操作による結合の確認と再生条件検討 40

3.2.2 Wizard を用いた再生条件の至適化 44

3.3 濃度測定 50

3.3.1 Wizard を用いた濃度測定 50

１）直接法 50

２）阻害法 70

4. シャットダウン 83

4.1 実験の終了 83

4.2 センサーチップの取り出し 83

4.3 電源のオフ 83

5. メンテナンス 84

5.1 日々のメンテナンス 84

5.2 毎週のメンテナンス 84

目次

5.3 毎月のメンテナンス.....86
5.4 Surface Prep ユニットのメンテナンス.....88

6. システムの診断.....**90**

7. ユーザー権限の管理.....**94**

7.1 ユーザー権限.....94
7.1.1 ユーザーレベルのセキュリティー.....94
7.1.2 Project レベルのセキュリティー.....94
7.2 Project の公開（BIAadministrator、BIAdeveloper）.....96
7.3 公開された Project の使用（BIAuser）.....100

1. セットアップ

1.1 電源およびソフトウェアの起動

1.1.1 電源の立ち上げおよび緩衝液の準備

電源安定化装置 → プリンター → モニター画面 → システム本体 → コンピューター の順番に電源を入れる。

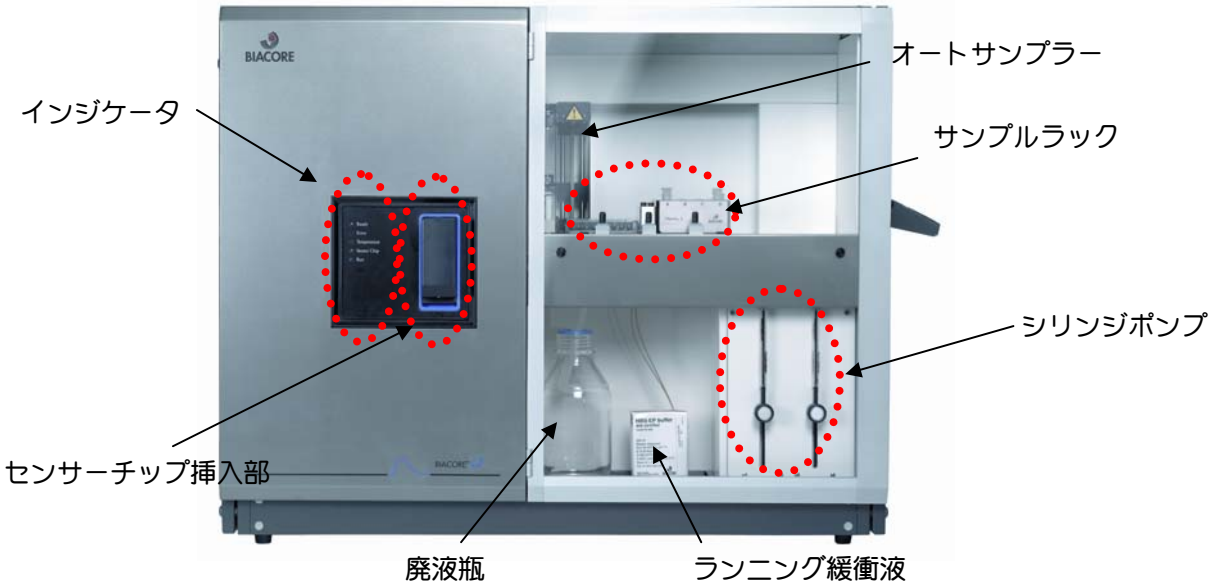
↓

本体のフロントパネル上の左にあるインジケータ（ライト）が点灯し、30 秒程でリセット後、新たに必要事項のみが点灯あるいは点滅する。

↓

システム本体のドアを開け、本体右側下部の細い 2 本のインレットチューブをランニング緩衝液のボトルに入れ、太いシリコンチューブを廃液入れの空ボトルに入れる。

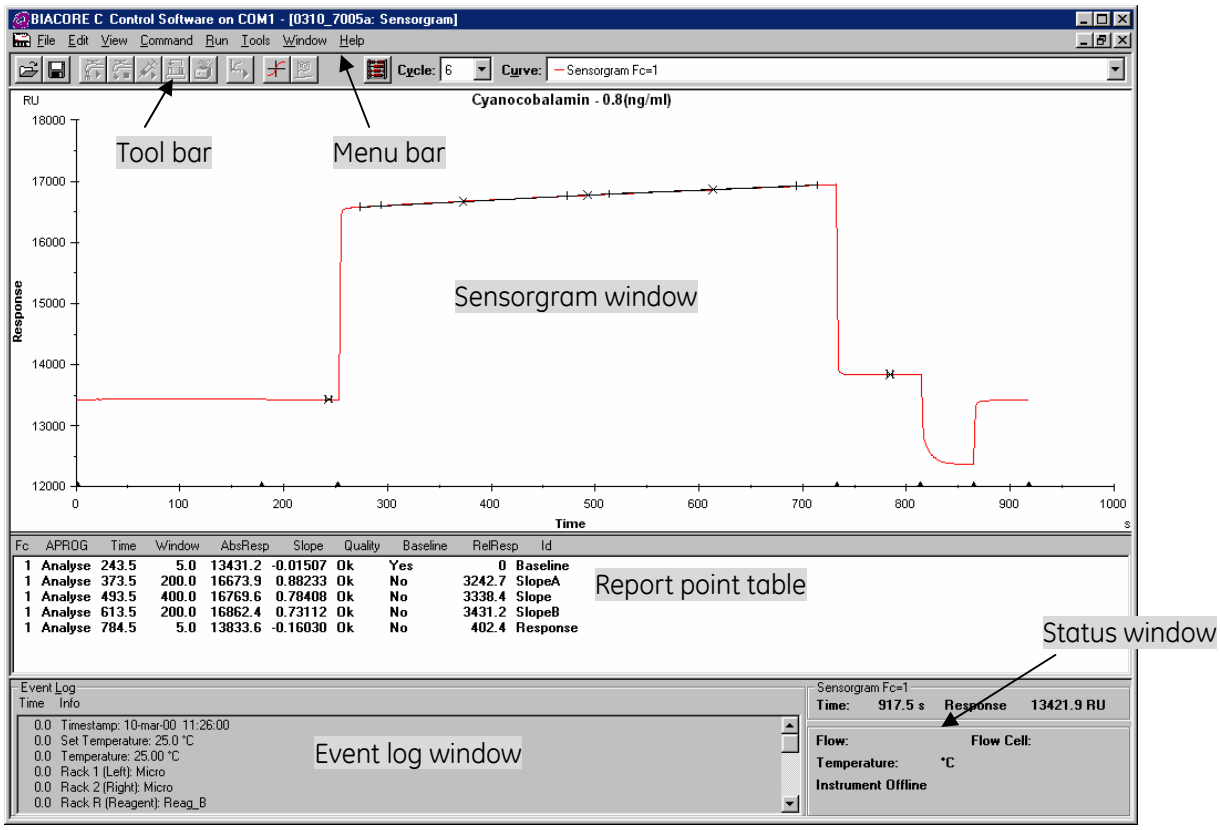
装置の配置



1.1.2　コントロールソフトウェアの起動

モニター初期画面中の左下の Start を押し、BIA Programs 中の

Biacore Q Control Software をクリックする。



Fc	APROG	Time	Window	AbsResp	Slope	Quality	Baseline	RelResp	Id
1	Analyse	243.5	5.0	13431.2	-0.01507	Ok	Yes	0	Baseline
1	Analyse	373.5	200.0	16673.9	0.88233	Ok	No	3242.7	SlopeA
1	Analyse	493.5	400.0	16769.6	0.78408	Ok	No	3338.4	Slope
1	Analyse	613.5	200.0	16862.4	0.73112	Ok	No	3431.2	SlopeB
1	Analyse	784.5	5.0	13833.6	-0.16030	Ok	No	402.4	Response

画面の説明

Menu bar

すべての操作コマンドが含まれている。

Tool bar

使用頻度の高いコマンドをアイコン化して表示。

Sensorgram window

センサーグラムを表示。

Report point table

指定した時間におけるレスポンスを数値で表示。固定化量や結合量の表示等に使用。

Event log window

測定中の操作内容を記録。Sensorgram window の X 軸上に表示される▲の時間と対応。

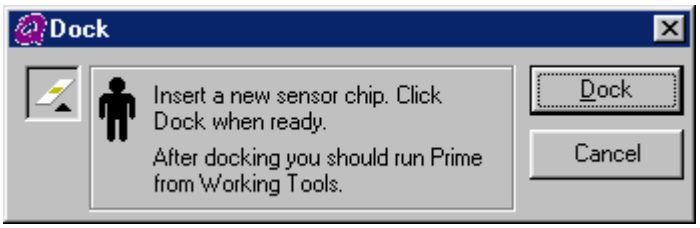
Status window

現在のシステムの状態（流速、温度、測定フローセル）を表示。

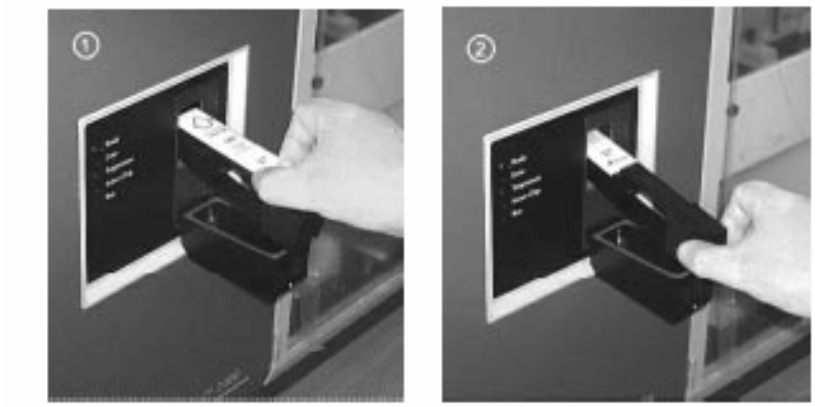
1.2　システムの初期化

1.2.1　センサーチップの挿入（Dock）

ソフトウェアを立ち上げると Dock のボックスが自動的に表示される。



↓



黒いカバーを開け、コンベアを手前に引く。センサーチップの表に印字された文字が読める向きでセットする。コンベアを押し込んで挿入し、カバーを戻す。
（センサーチップが正しく挿入されると、フロントパネルの Sensor chip のインジケータが緑色に点滅する。）

↓

ボックス中の Dock をクリックする。

↓

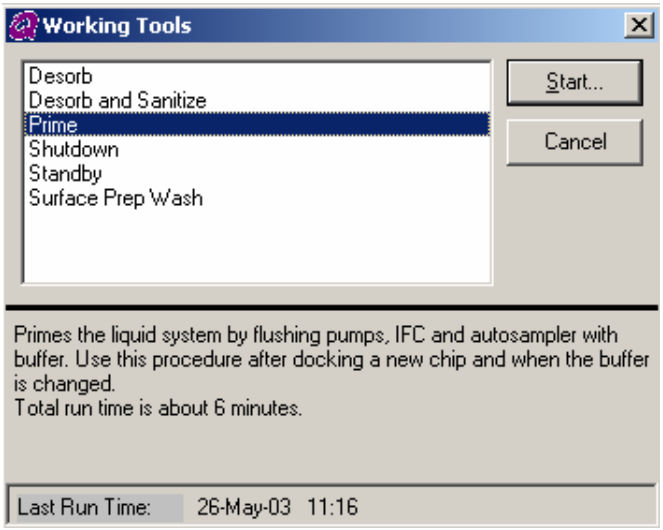
Dock が終了すると、フロントパネルの Sensor chip のインジケータが緑色の点灯に変わる。

Dock 操作における注意事項・解説

センサーチップ内のプラスチックシートがセンサーチップのカバーにしっかり収まっていることを確認してから挿入する。
センサーチップの交換は必ず Undock の状態でおこなう。インジケータの Sensor chip が緑色の点灯時（Dock 状態）に、強引にセンサーチップを抜かないこと。
センサーチップを冷蔵庫から取り出した場合には、室温に戻した後、包装あるいは容器から取り出すようにする。

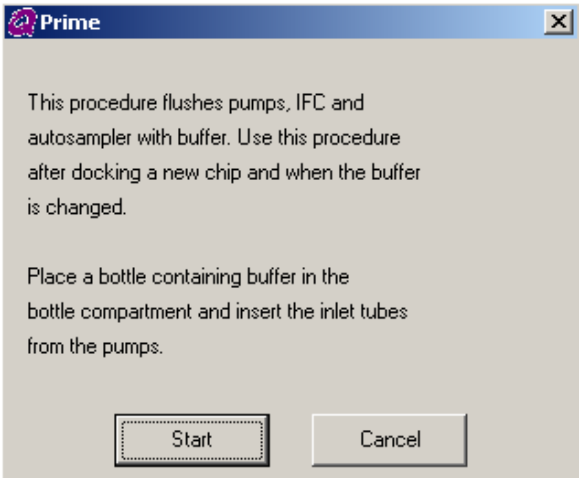
1.2.2　ランニング緩衝液による平衡化（Prime）

Dock 操作終了後、自動的に Working Tools のボックスが開き、Prime が選択される。


Working Tools
Desorb
Desorb and Sanitize
Prime
Shutdown
Standby
Surface Prep Wash
Start...
Cancel
Primes the liquid system by flushing pumps, IFC and autosampler with buffer. Use this procedure after docking a new chip and when the buffer is changed.
Total run time is about 6 minutes.
Last Run Time: 26-May-03 11:16

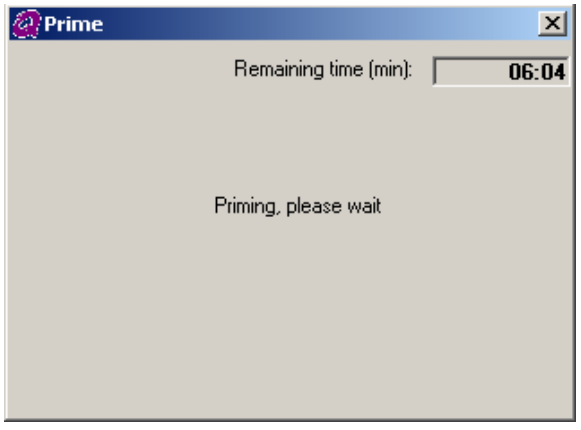
ランニング緩衝液および廃液入れを確認後、**Start...**をクリックする。

↓


Prime
This procedure flushes pumps, IFC and autosampler with buffer. Use this procedure after docking a new chip and when the buffer is changed.
Place a bottle containing buffer in the bottle compartment and insert the inlet tubes from the pumps.
Start
Cancel

Prime の内容が表示される。確認後、**Start** をクリックする。

↓



約 6 分間 Prime が実行される。

↓

Prime が終了すると終了確認のボックスが表示される。**Exit** をクリックし、終了する。

Prime における注意事項・解説

Prime は、ポンプやマイクロ流路系、オートサンプラー等をランニング緩衝液で洗浄、置換する操作である。新しくセンサーチップをセットした時や、実験途中にランニング緩衝液を交換する場合に実施する。

Prime は、Tools → Working Tools の中からも選択できる。

ランニング緩衝液

純正の緩衝液は、フィルターろ過、脱気済みである。

HBS-EP :10 mM HEPES / 0.15 M NaCl / 3 mM EDTA / 0.005% Surfactant P20（pH7.4）

HBS-P :10 mM HEPES / 0.15 M NaCl / 0.005 % Surfactant P 20（pH7.4）

HBS-N :10 mM HEPES / 0.15 M NaCl（pH7.4）

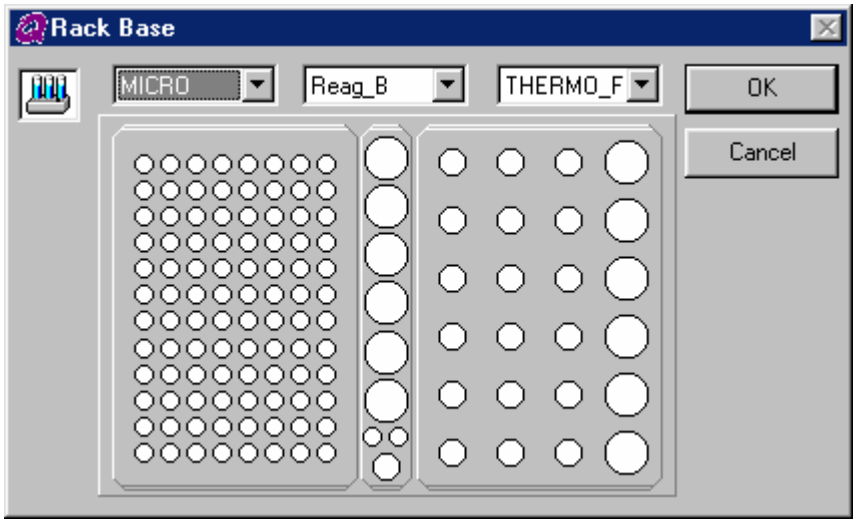
実験目的にあわせ、緩衝液の変更は可能である。各自で調製する場合には、0.22 µm フィルターでろ過をおこない、実験前に十分脱気をおこなう。

1.2.3　ラックベースの設定

使用するサンプルラック（サンプルチューブを立てるもの）にあわせて、ラックベースの設定をおこなう。

Command → **Rack Base...**をクリックする。

↓



をクリックし選択する。（サンプルラックの種類等については「ラックに関する説明」（7ページ）を参照する。）

↓

設定後 OK をクリックする。

ラックに関する説明

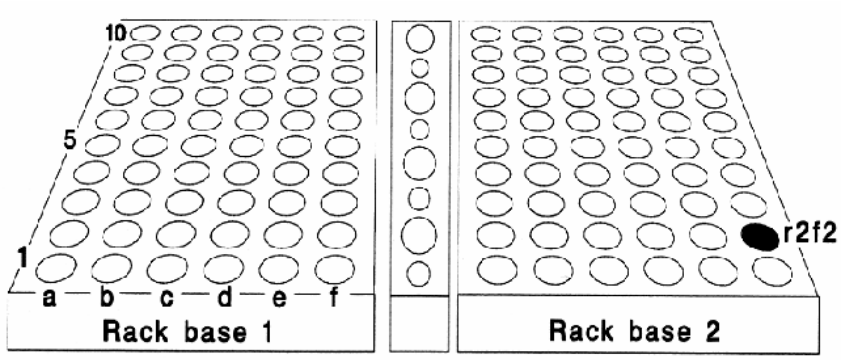
ラックベース（ラックをセットする場所）は向かって左側が Rack Base1、右側が Rack Base2 となる。
ラックは Thermo_F、Reag B、Reag C の 3 種類がある。

各ラックベースには次のラックまたは 96 穴マイクロタイタープレートをセットできる。

Rack base1 / Rack base2	Themo_F
	96 穴マイクロタイタープレート
Reagent rack base	Reag B
	Reag C

各ラックには次のバイアルをセットできる。

Thermo_F	11mm	プラスチックチューブ
	16mm	ガラスバイアル
Reag B	7mm	プラスチックバイアル
	11mm	プラスチックチューブ
	16mm	ガラスバイアル
Reag C	7mm	プラスチックバイアル



ラックのサンプルの位置は以下のように指定される。
ラックベースは向かって左側が Rack Base1、右側が Rack Base2 となる。たとえば、右側のラックの “f” の列の 2 番目のサンプル（黒く塗りつぶした位置）は、r2f2 となる。96 穴マイクロタイタープレートの場合にも同様な方法で設定する。Reag B ラックでの位置の設定は、手前から rr1、手前から 2 列目左 rr2、右 rr3、3 列目 rr4…となる。Reag C ラックでの位置の設定は、手前左 rra1、手前右 rrb1、最後尾左 rra10、最後尾右 rrb10 である。

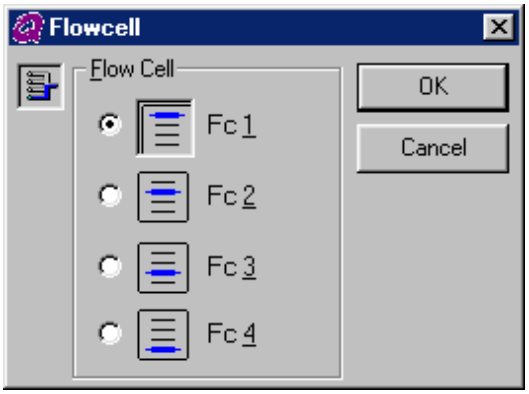
2.　基本操作（マニュアル操作）

2.1　サンプル、試薬類の添加

添加するサンプル、試薬類をラックにセットする。（ここでは Biacore Maintenance Kit 中の BIAtest solution を使用する。）

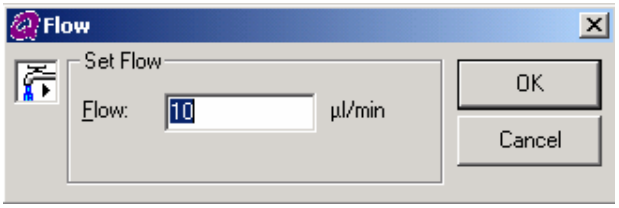
↓

あるいは **Run** → **Run Sensorgram...**をクリックする。



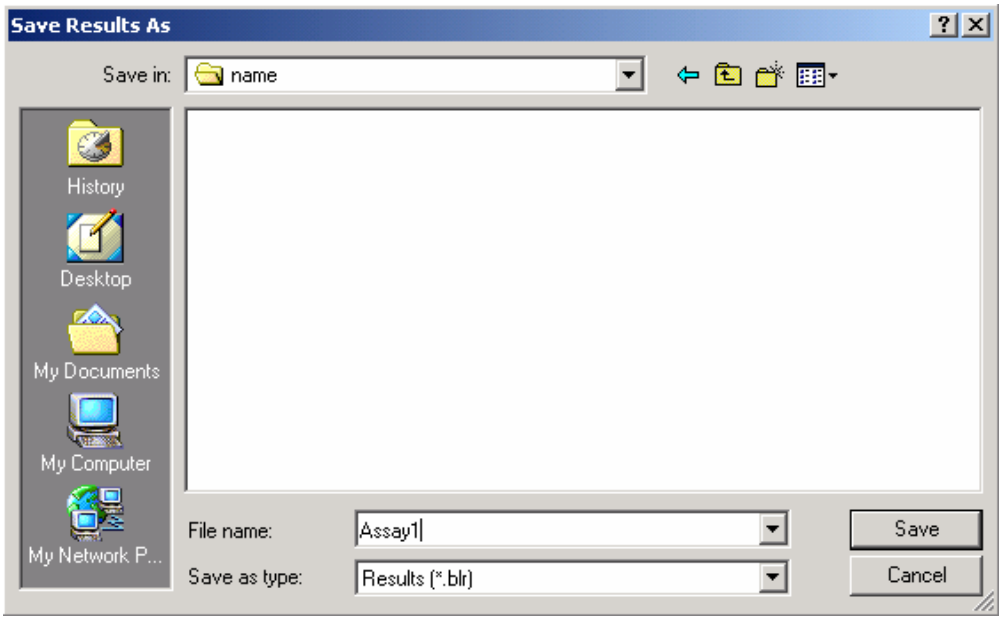
使用するフローセルの選択をおこない、**OK** をクリックする。

↓



流速（1～100 µl/min）を入力後、**OK** をクリックする。

↓



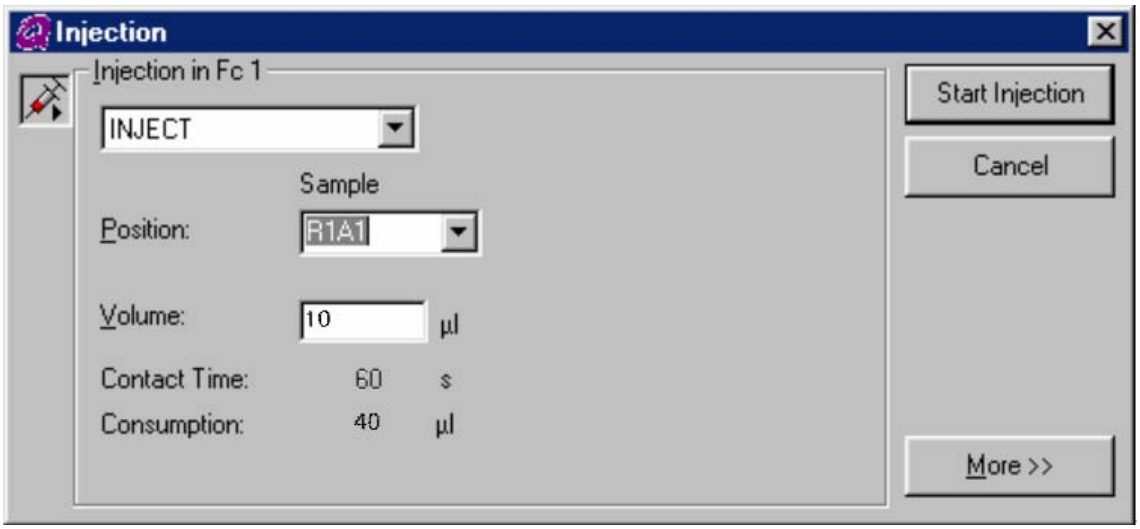
結果の保存先を設定する。C：＼BIA Users＼（個別のフォルダ）に移動後、ファイル名を入力し、**Save** をクリックする。

↓

（センサーグラムが表示され、測定が開始する。）

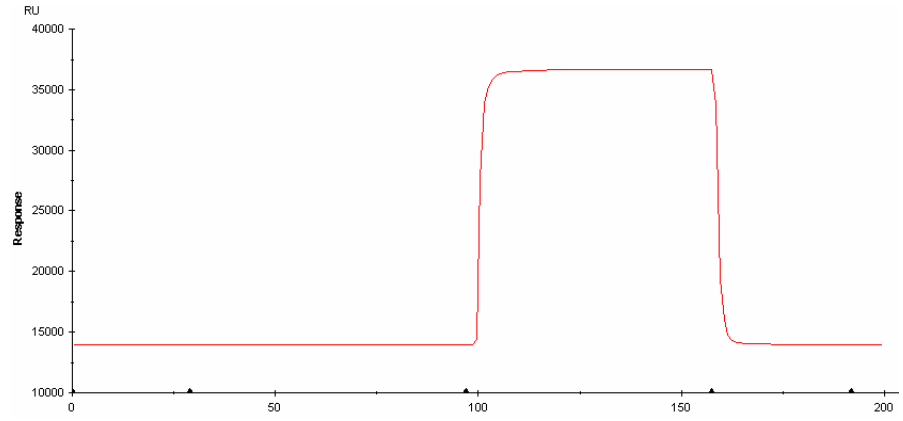
↓

あるいは **Command** → **Inject...**をクリックする。



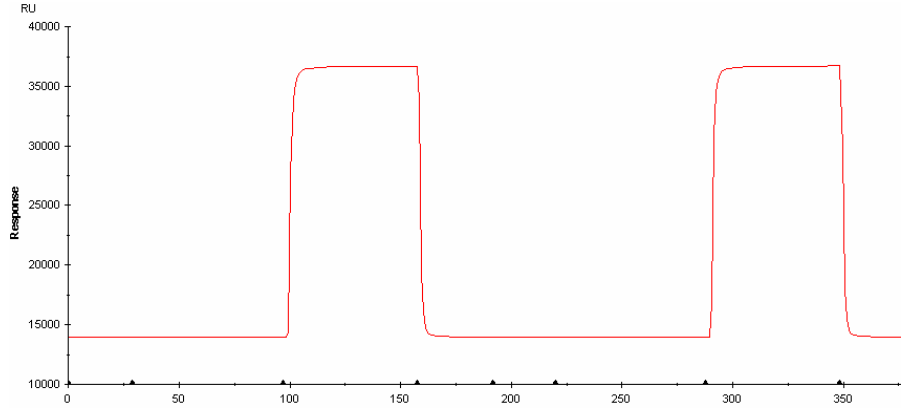
添加するサンプル、試薬類のポジションおよび添加容量を入力する。

Consumption で表示された容量をセットし、**Start Injection** をクリックする。



↓

引き続き、他のサンプル、試薬類について添加する場合には、 あるいは **Command** → **Inject...**をクリックし、同様の操作をおこなう。



↓

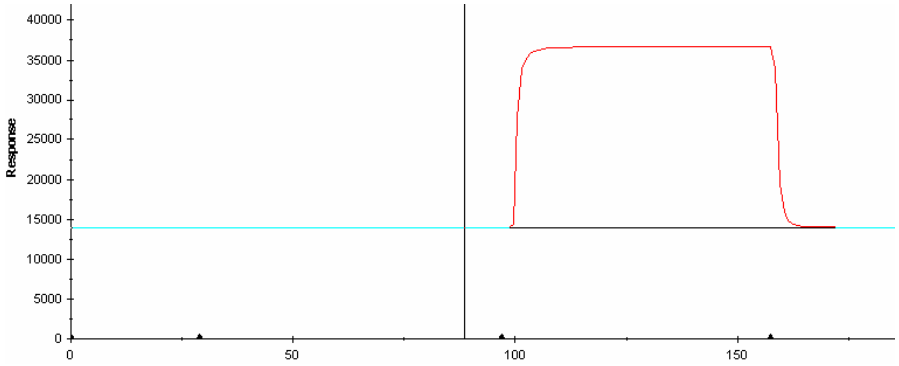
すべての添加が終了したら、 あるいは **Run** → **Stop Sensorgram** をクリックし、測定を終了する。

2.2　レスポンスの数値化

センサーグラム上の任意の時間におけるレスポンス（RU）をセンサーグラムウインドウ下のレポートポイントテーブルに表示する。

あるいは **View** → **Reference Line** をクリックし、センサーグラム上にリファレンスラインを表示する。

↓

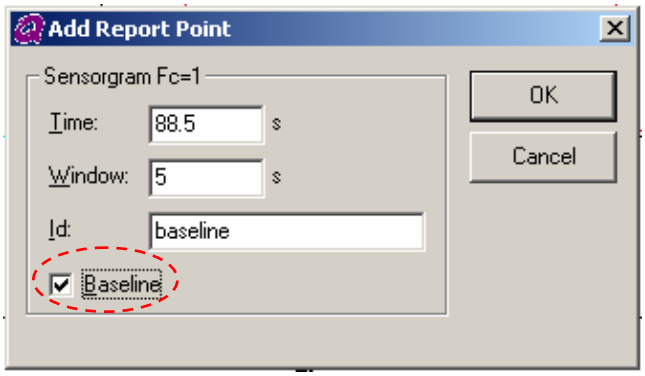


リファレンスラインをレポートポイントの取りたい位置に移動する。
（マウスのカーソル（矢印）をリファレンスラインの縦軸上にあわせ、左クリック・ドラッグすると、リファレンスラインの縦軸と横軸の交点がセンサーグラム上を移動する。または、レポートポイントを取りたいセンサーグラム上の位置を左クリックすると移動する）

↓

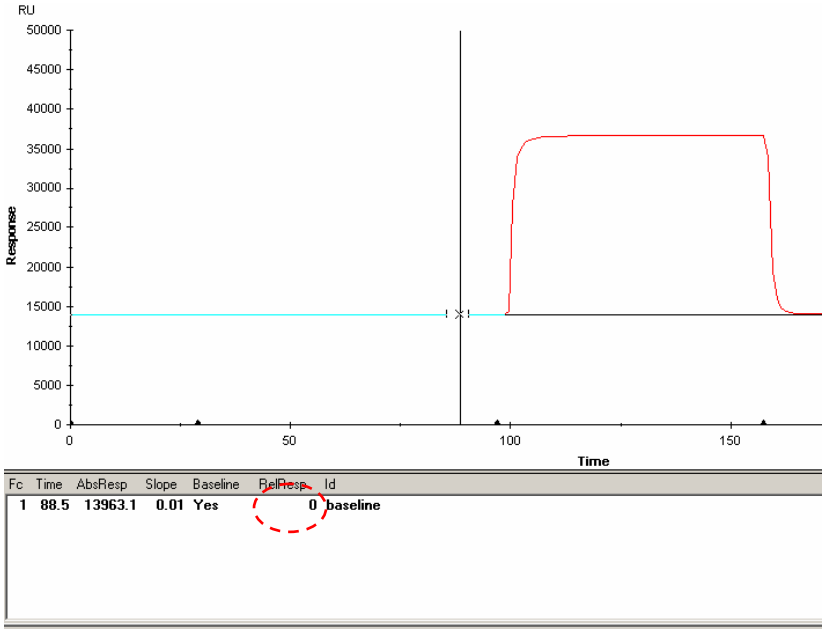
あるいは **Edit** → **Add Report Point** をクリックする。

↓



Id の欄にコメントを入力し、**OK** をクリックする。そのポイントを 0 基準とし、その後のポイントを相対値表示する場合は、**Baseline** にチェックをいれる。

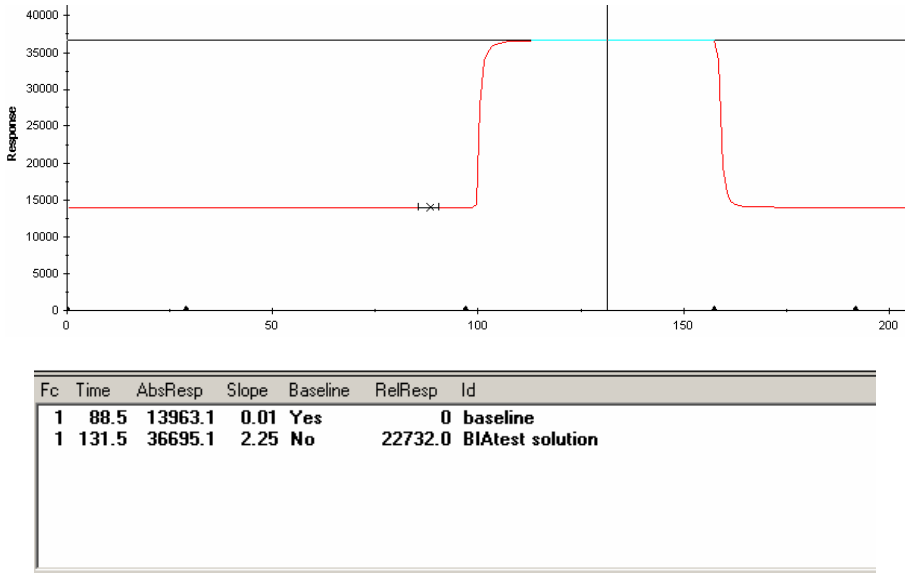
↓



レポートポイントテーブル中にレスポンスが記録される。相対値（RelResp）の値は 0 と表示される。

↓

リファレンスラインを次のポイントに移動後、同様にレポートポイントをとる。レポートポイントテーブル中にレスポンスが記録され、相対値表示を設定していた場合は、RelResp の欄にベースラインからの相対値が表示される。



↓

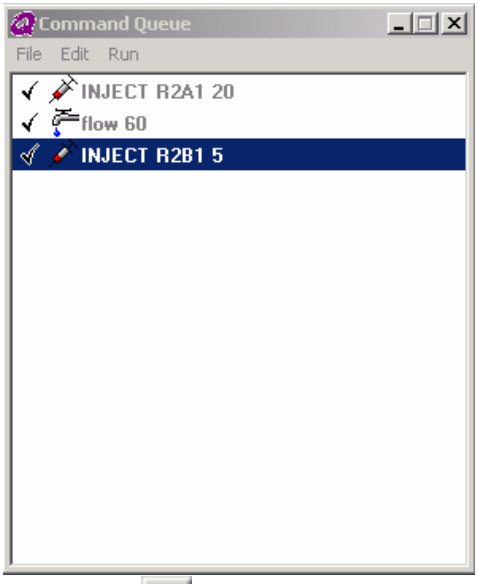
レポートポイントを取り終わったら、 あるいは **View** → **Reference Line** をクリックし、センサーグラム上からリファレンスラインを消す。

レポートポイントにおける注意事項・解説

レポートポイントは、ボックス中の **Window** に示された秒間隔における平均値である。この間隔は、2 秒以上で設定することが可能。
レポートポイントの名前等を変更、または消去する場合には、レポートポイントテーブル中の文字列をダブルクリックし入力ボックスを呼び戻す。内容の変更や、ボックス中の **Delete** ボタンをクリックし消去ができる。

Command　Queue

測定を開始すると Command Queue ボックスのアイコンがグラフ右上に表示され、入力した操作コマンドを確認することができる。また、実行したいコマンドの予約を入力することができ、入力したコマンドは上から順番に実行される。入力したコマンドを削除する場合はそのコマンドを選択後、 **Edit** → **Delete**、コマンド間にコマンドを挿入する場合には **Edit** → **Insert** で変更する。



Command Queue は右上の縮小ボタン をクリックしてアイコン化（縮小）することができる。また、アイコンをクリックすると再びボックスを開くことができる。

添加の中止

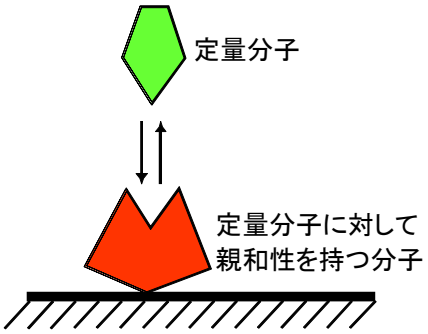
添加を途中で中止する場合には、アイコン（ ）もしくは **Command** → **Stop Inject** をクリックする。ニードルに残ったサンプルは設定したポジション（あるいは WASTE）に戻すことができる。

3.　濃度測定

測定系として、直接法と阻害法の 2 種類が主に用いられる。

＜直接法＞

定量分子に対して親和性を持つ分子を固定化したセンサーチップに、定量するサンプルを添加し、得られる結合レスポンスから濃度を決定する方法である。高分子量の定量に適している。系の構築が容易で、測定時間が短く、広範囲の定量が可能である。



実験手順

①　定量分子に対して親和性を持つ分子の固定化

②　検量線の作成

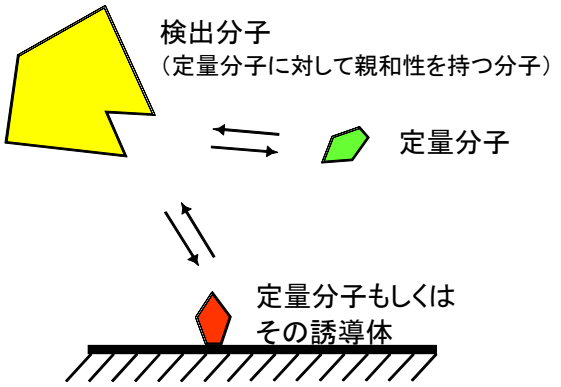
さまざまな濃度既知の定量分子を□の固定化表面に添加し、各濃度における結合レスポンスを測定し、検量線を作成する。

③　濃度測定

定量したいサンプルを①と同様に添加し、得られる結合レスポンスを②で作成した検量線より求める。

＜阻害法＞

定量分子もしくはその誘導体を固定化したセンサーチップに、定量分子に対して親和性を持つ分子（検出分子）と定量分子の混合液を添加する。結合レスポンスから、定量分子の濃度を誘導する方法である。低分子の定量、低濃度領域の測定に適している。



実験手順

①　定量分子もしくはその誘導体の固定化

②　検量線の作成

一定濃度の検出分子（定量分子に対して親和性を持つ分子）とさまざまな濃度既知の定量分子の混合液を①の固定化表面に添加し、各定量分子の濃度における結合レスポンスを測定し検量線を作成する。

③　濃度測定

定量したいサンプルを②と同様に混合添加し、得られる結合レスポンスを②で作成した検量線より求める。

3.1　固定化

固定化する分子は結合の特異性やキャパシティーに大きく作用するので、90%以上の精製度のものを使用する。

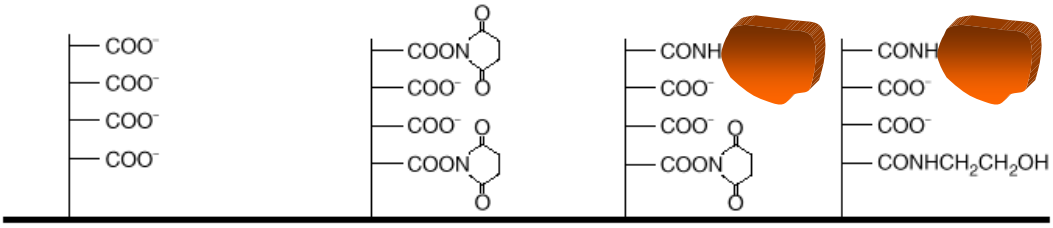
3.1.1　固定化方法

固定化方法（CM5 を使用する場合）には以下のような方法がある。

●アミンカップリング

固定化分子の表面に存在するアミノ基（N 末端アミノ基あるいはリジン ε-アミノ基）を利用して固定化する方法。

CM デキストランのカルボキシル基を NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）で活性化し、分子を固定化する。最後に、残った活性 NHS 基をエタノールアミンでブロッキングする。



●チオールカップリング

・リガンドチオールカップリング

固定化分子の表面に存在する遊離型チオール基を用いて固定化する方法。

・表面チオールカップリング

センサー表面にチオール基を導入し、固定化分子のカルボキシル基を介して固定化する方法。

●アルデヒドカップリング

大量の糖鎖を持つムチンタンパク質等を糖鎖の非還元末端を利用して固定化する方法。

ここでは、最も一般的な固定化方法、アミンカップリング法について詳しいプロトコールを紹介する。

＜アミンカップリング法＞

（準備するもの）

・**アミンカップリングキット**（弊社販売品）

・**ランニング緩衝液**（トリスあるいはグリシン緩衝液等の 1 級アミンを含まないもの）

・**固定化分子**（アジ化ナトリウム等の求核性物質を含まないもの）

・**固定化分子希釈液**

・アミンカップリングキット

アミンカップリングキットには、以下の試薬が含まれている。

EDC(N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochroride)

NHS(N-hydroxysuccinimide)

1M ethanolamine hydrochloride 溶液(pH 8.5)

（試薬の調製方法）

キットに添付されている説明書に従い、EDC および NHS をそれぞれ 10　ml の MilliQ 水に溶解する。直ちにそれぞれの試薬を 200 µl ずつ、0.5 ml 容のマイクロチューブあるいは 7mm プラスティックバイヤル（弊社発売）に小分けし、蓋をして使用直前まで-20℃で冷凍保存する。使用に際して 1 組ずつの試薬を取り出し、溶解後使用する。溶解後の試薬の再凍結はできない。エタノールアミンは、溶液で供給されており、4℃で保存する。200 µl ずつ小分けしておくか、使用直前にサンプリングする。

・固定化分子希釈液

タンパク質の場合

濃度は通常 5～200µg/ ml 程度になるよう **10mM 酢酸緩衝液**で希釈して固定化をおこなう。酢酸緩衝液の pH は等電点より 0.5～2 低い pH か、18～20 ページに示したプレコンセントレーション操作により決定した pH を用いる。また、固定化分子希釈用緩衝液は非アミン系で比較的低塩濃度（10mM）のものを使用する。希釈用緩衝液は pH3.5 以下のものは使用しない。pH4.0 でプレコンセントレーション効果がみられないような酸性タンパク質の場合は、表面チオール法による固定化、もしくは固定化分子をビオチン化後、SA チップへ捕捉する方法をお勧めする。

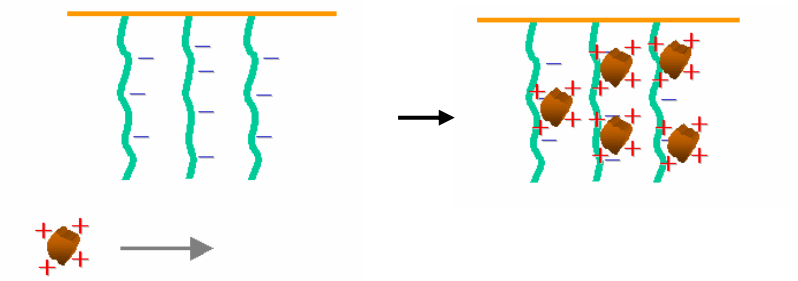
ペプチドや低分子物質の固定化

ペプチドや化合物等の低分子物質の固定化の場合は、プレコンセントレーションの効果が見られない場合がある。この場合は、高濃度の溶液を使用し、弱アルカリ性条件で固定化をおこなう。希釈液として、10mM～50mM 炭酸緩衝液（pH 8.5）/1M NaCl を使用し、サンプル濃度を 100µg/ ml 以上の比較的高濃度を使用する。

3.1.2　プレコンセントレーションの検討（マニュアル操作）

<u>プレコンセントレーションとは</u>

タンパク質の固定化操作において、センサー表面の CM デキストランに存在するカルボキシル基は非常に重要である。タンパク質を正に荷電した状態で添加すると、負に荷電している CM デキストランとの間に静電気的な相互作用が生じ、タンパク質をデキストラン中に濃縮することができる。この方法を用いることで固定化効率を上昇させることができる。タンパク質を効率よく固定化するために等電点よりも低い pH の緩衝液に希釈し、正に荷電させる。等電点が既知のサンプルの場合は、等電点よりも 0.5～2 低い pH 条件を使用し、等電点が不明な場合には、**「プレコンセントレーションの検討」**をおこない、固定化に適する固定化分子希釈液の pH を調べる。**何も処理していないフローセル**を使用し、各 pH におけるセンサー表面へのタンパク質の濃縮の程度を見る。この操作により**タンパク質は固定化されることはない**。添加終了後、濃縮しているタンパク質は、ランニング緩衝液に置換された後に、速やかにデキストランから解離する。タンパク質がデキストランに非特異的吸着を起こしている場合は、引き続き、洗浄溶液（例えば 50mM NaOH を 30 秒間）等添加し、洗浄をおこなう。プレコンセントレーションに使用したセンサーチップはそのまま固定化に利用することができる。



プレコンセントレーションの検討はマニュアル操作にておこなう。

サンプル調製例

タンパク質を最終濃度で約 20µg/ ml になるよう各緩衝液で希釈する。

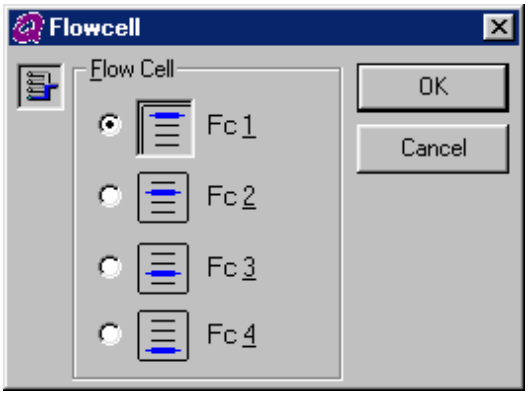
- 10mM 酢酸緩衝液（pH 6）　100 µl
- 10mM 酢酸緩衝液（pH 5）　100 µl
- 10mM 酢酸緩衝液（pH 4）　100 µl

サンプルをラックにセットする。

↓

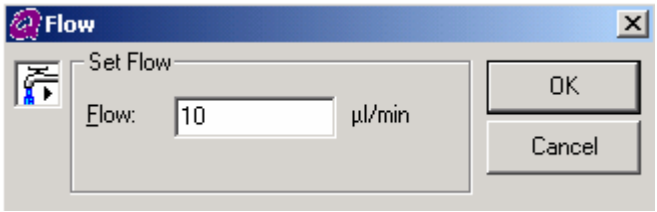
アイコン（ ）あるいは **Run** → **Run Sensorgram...**をクリックする。

↓



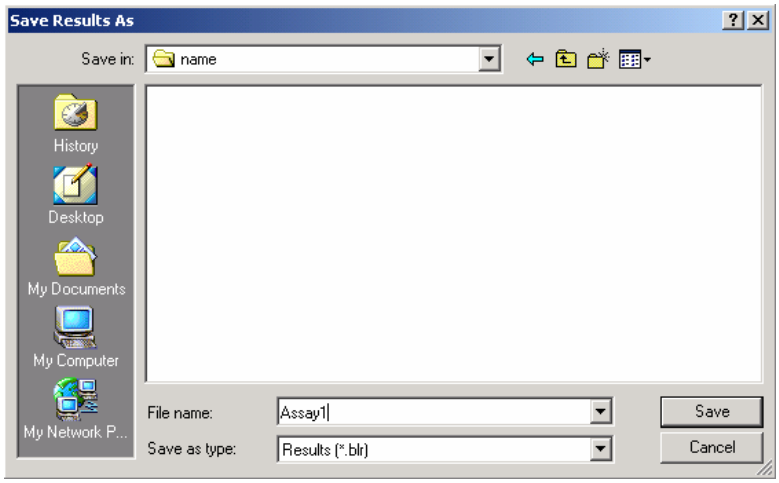
使用する流路を選択し、**OK** をクリックする。

↓



流速（1～100 µl/min）を入力後、**OK** をクリックする。ここでは 10 µl/min 程度を使用する。

↓



結果の保存先を設定する。C／BIA Users／（個別のフォルダ）に移動後、ファイル名を入力

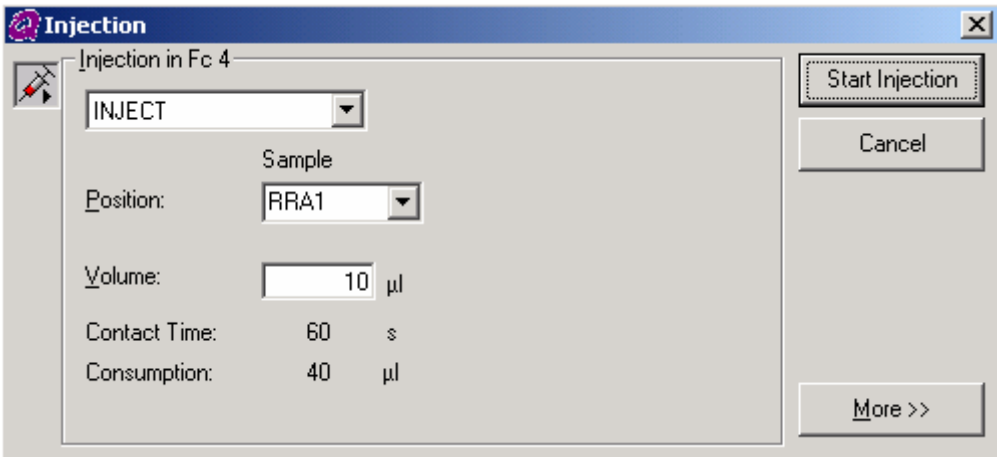
し、**Save** をクリックする。

↓

（センサーグラムが表示され、測定が開始される。）

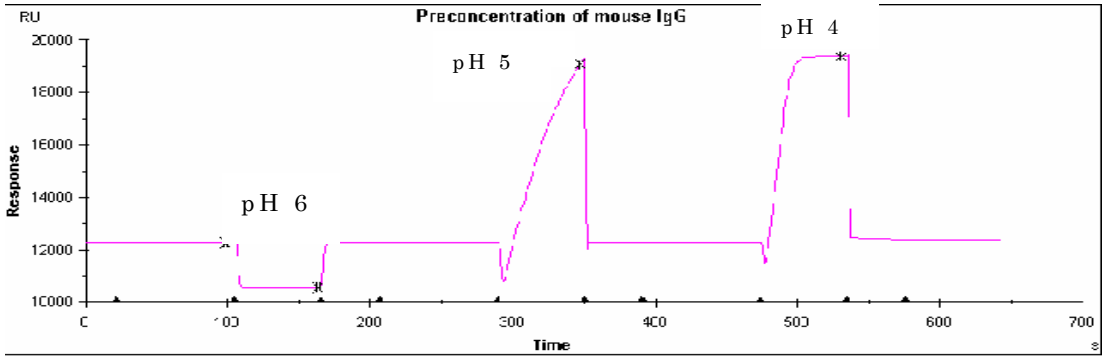
↓

あるいは **Command** → **Inject...**をクリックする。



添加するサンプルのポジションおよび添加容量を入力し、**Start Injection** をクリックする。
引き続き、他の pH のサンプルに関しても同様の操作をおこなう。

↓



↓

アイコン（ ）もしくは **Run** → **Stop sensorgram** をクリックし、測定を終了する。

プレコンセントレーションの評価について

プレコンセントレーション効果は、希釈緩衝液の pH を下げれば増加することが多い。しかし、活性型 NHS 基とアミノ基とのカップリング効率は pH8.5 が最も高い。上記のセンサーグラムの場合、pH4 と 5 は同程度の濃縮効果が見られるが、カップリング効率を考慮すると pH 5 が望ましい。また、タンパク質の安定化のためにはできるだけ高めの pH を使用する。よって、濃縮効果のある一番高い pH 条件を採用する。上記の場合、pH5 が適している。

3.1.3　IFC を用いた分子の固定化（Wizard 操作）

＊水溶性分子を固定化する場合は IFC、有機溶媒に溶解している分子を固定化する場合は、**Surface Prep** を選択する。

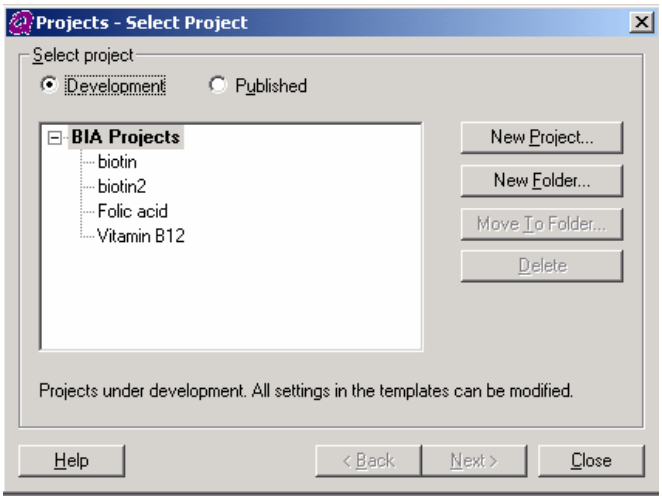
以下では水溶性分子のアミンカップリング法での固定化について記載する。マニュアル操

作でもおこなうことができるが、ここでは、**Wizard 操作による固定化**について記載する。

Run□**Run Project…**をクリックする。

↓

↓

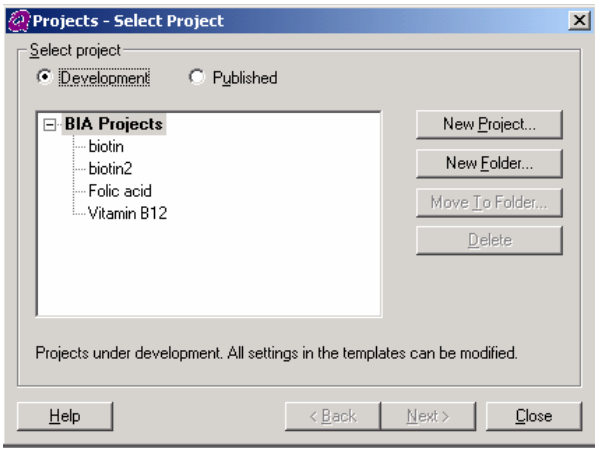


実験系を新規で立ち上げる場合は、BIA Projects フォルダ内に Project フォルダを作成する。（P21Project フォルダの作成参照）

Development を選択し、目的の Project フォルダを選択後、**Next >**をクリックする。

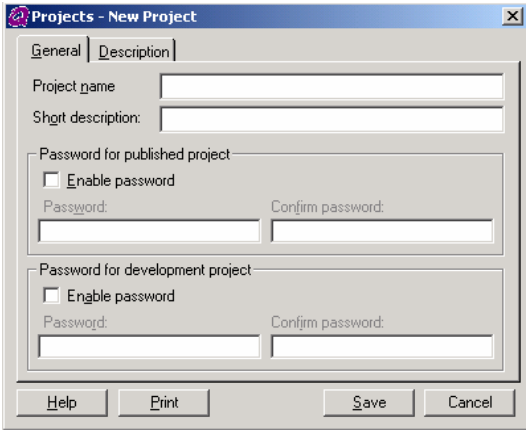
↓

Project フォルダの作成



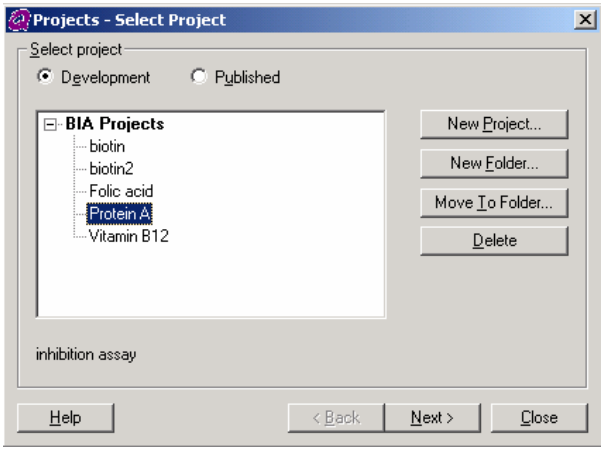
New Project...をクリックする。

↓

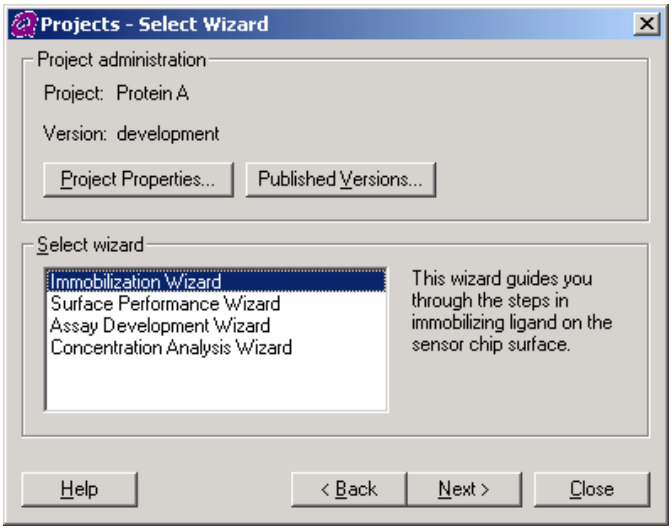


Project name にフォルダ名を入力し、**Save** をクリックする。

↓

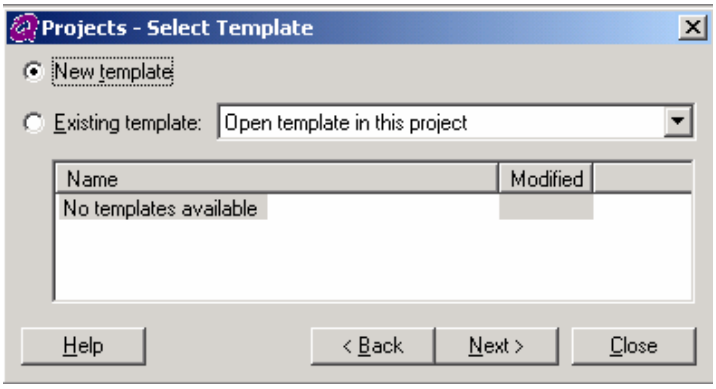


作成したフォルダが BIA Projects フォルダに追加される。



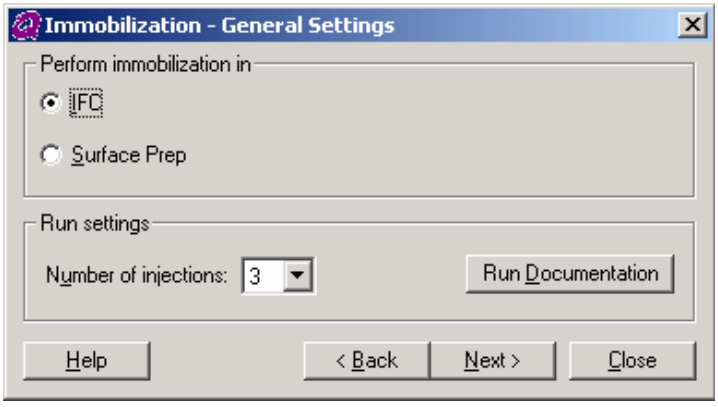
Immobilization Wizard を選択し、**Next>**をクリックする。

↓



New template を選択し、**Next>**をクリックする。

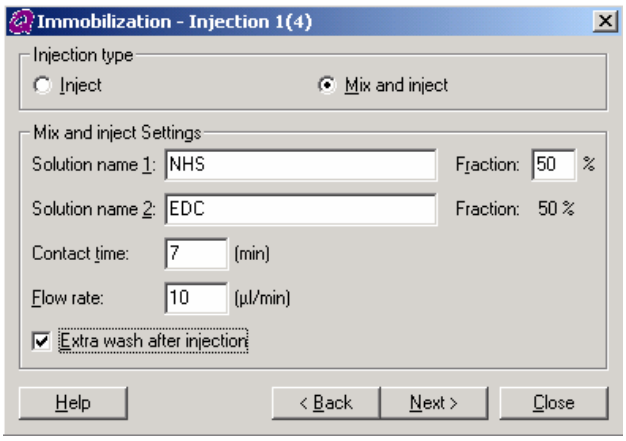
↓



Perform immobilization in で **IFC** を選択し、Run settings で固定化操作中におこなう添加操作の回数を選択する。アミンカップリングの場合、NHS/ EDC 混合溶液、リガンド溶液、ブロッキング溶液の添加をおこなうため、3 を選択する。

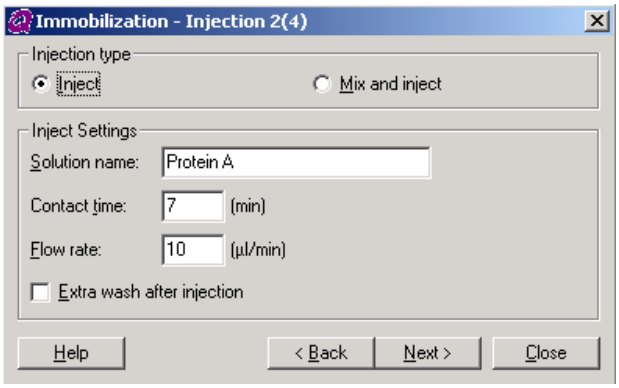
Next>をクリックする。

↓



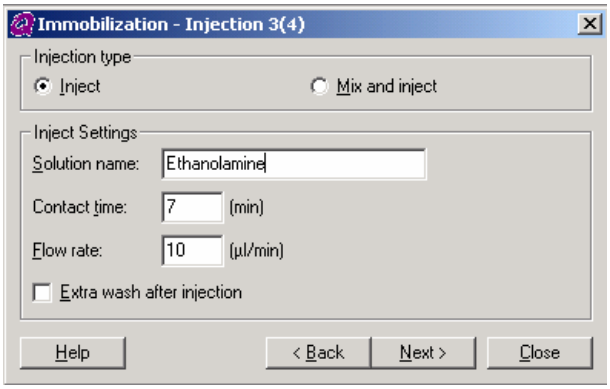
活性化に関するパラメータの設定をおこなう。活性化は EDC および NHS を混合後添加するため、Injection Type には **Mix and Inject** を選択する。混合割合は 50%、Contact time を 7 分、Flow rate を 10 µl/min に設定する。Extra wash after injection with をチェックし **Next>**をクリックする。

↓



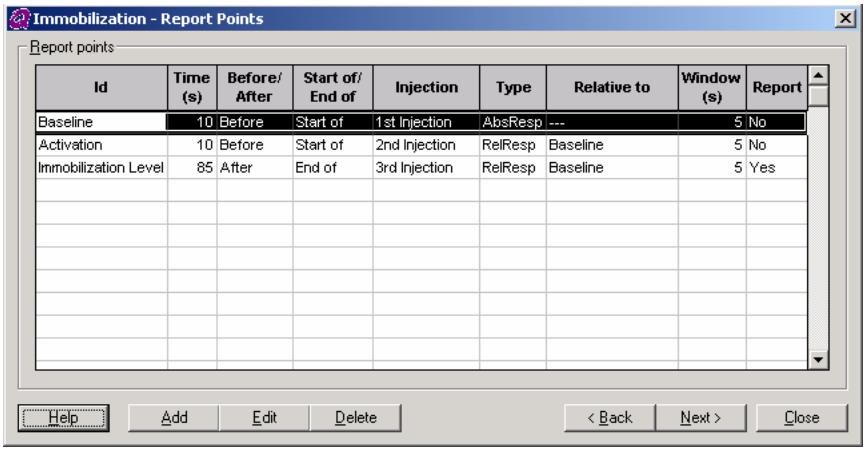
Solution name:に固定化分子の名前を入力し、**Next>**をクリックする。通常、Contact time は 7min、Flow rate は 10 µl/min で設定されている。

↓



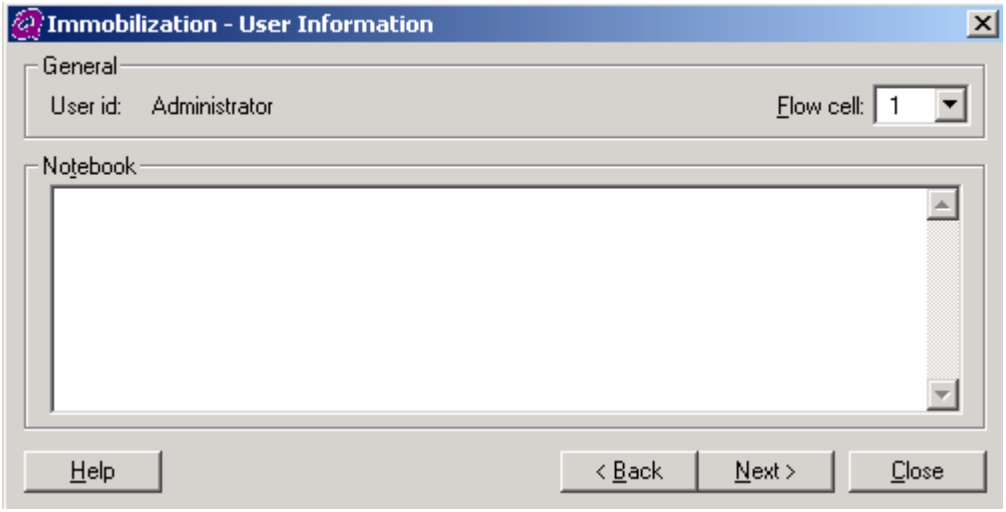
エタノールアミンの添加に関するパラメータの設定をおこなう。Contact time を 7 分、Flow rate を 10 µl/min に設定する。**Next>**をクリックする。

↓



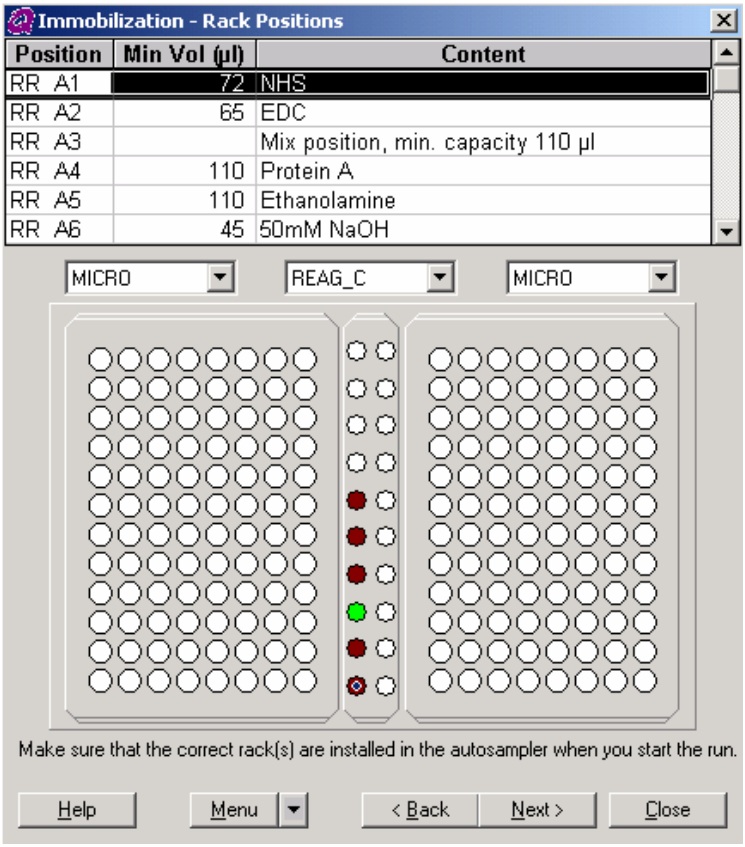
レポートポイントに関するパラメータの設定をおこなう。レポートポイントを設定することで、測定中の任意の時間におけるレスポンスを記録することができる。上記に示した Baseline および Immobilization Level の 2 つのポイントは、固定化量を確認するために必ず必要である。**Next>**をクリックする。

↓



固定化するフローセル番号を選択し、**Next>**をクリックする。(必要に応じて Notebook にメモを書き込む。)

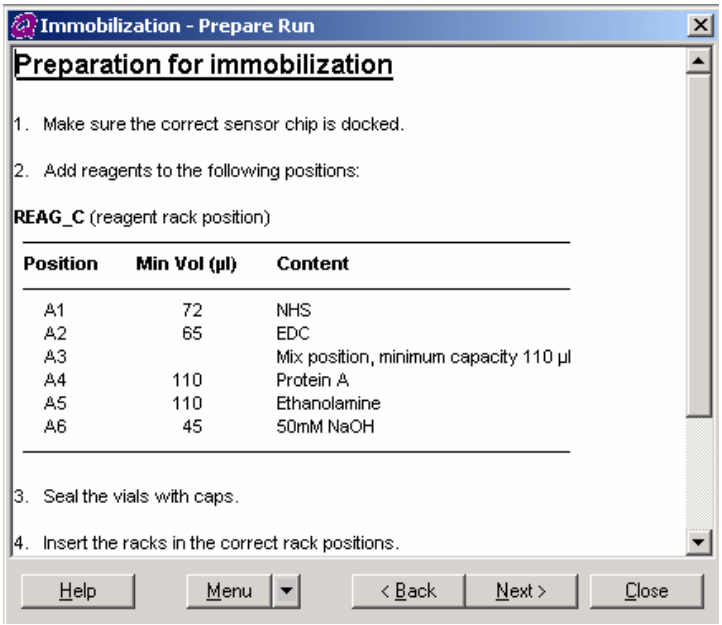
↓



画面とシステム本体にセットしているラックが同一であることを確認する。試薬は Min Vol（ µl）カラムの、必要量以上をセットする。

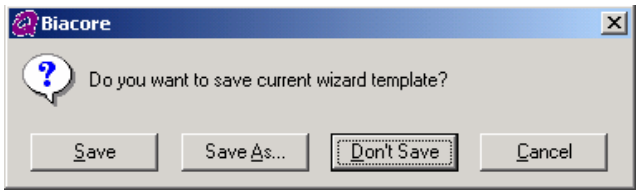
必要に応じて試薬の位置を変更することが可能である。その場合、使用するバイアルによって必要量が変わるため、位置変更後、必ず Min Vol（ µl）カラムの必要量を確認する。

↓



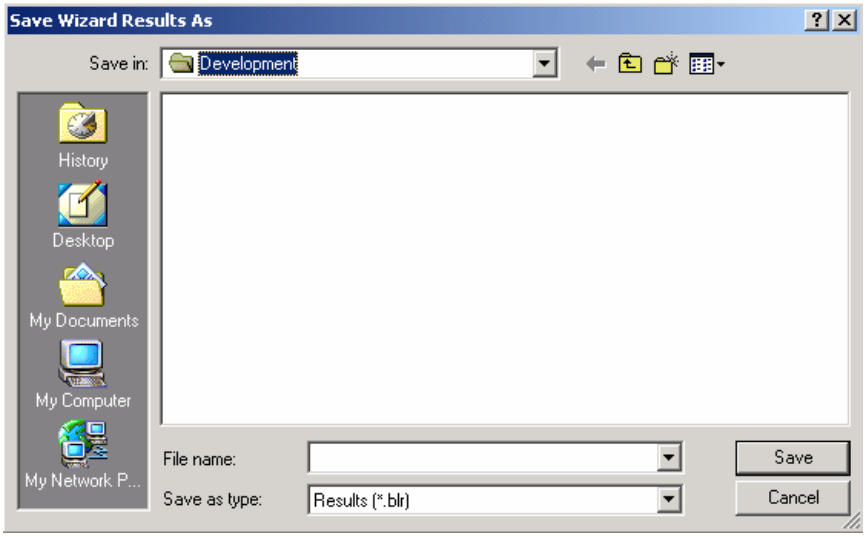
試薬の量、位置の再確認をおこなう。プログラムが長い場合は確認画面が複数枚に渡る。**Next>**をクリックして、全画面確認する。最後の画面になると Next>ボタンが Start に変わる。**Start** をクリックする。

↓



測定条件をテンプレートとして保存する場合は、**Save As...**を用いる。保存先は、Development（C : / BIA Projects /目的の Project フォルダ/ Immobilization / Development ）の中にする。保存をしない場合には **Don't Save** をクリックする。

↓

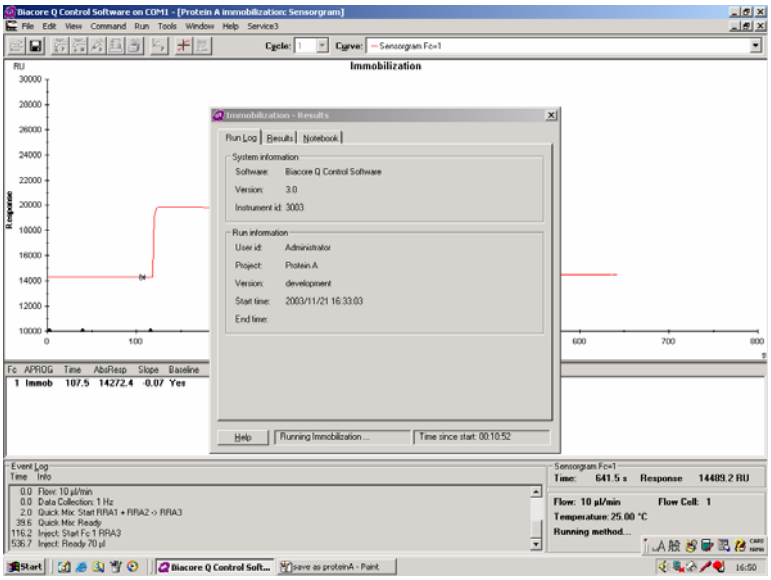


結果の保存先を設定し、ファイル名を入力して **Save** をクリックする。保存先は Development（C : / BIA Projects /　目的の Project フォルダ/ Immobilization / Development ）を選択する。

↓

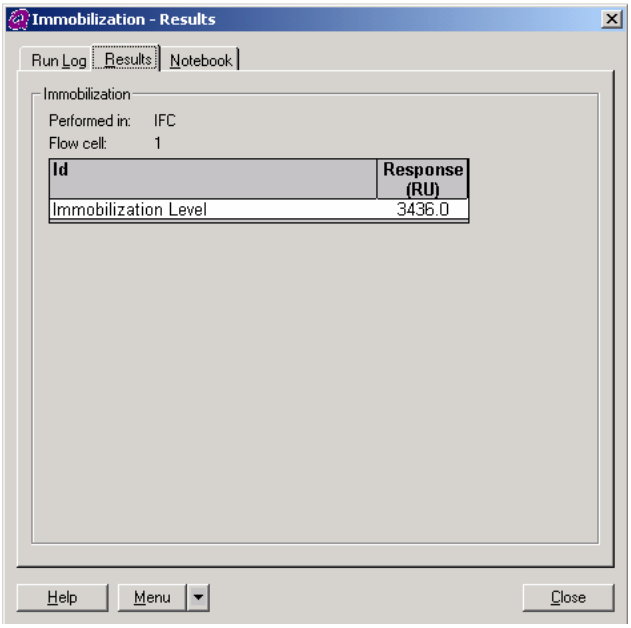
固定化操作が実行される。

（重要）
実行後に Wizard を強制終了する場合には、キーボードの
Ctrl（左下）＋ Break（右上）
を同時に押す。



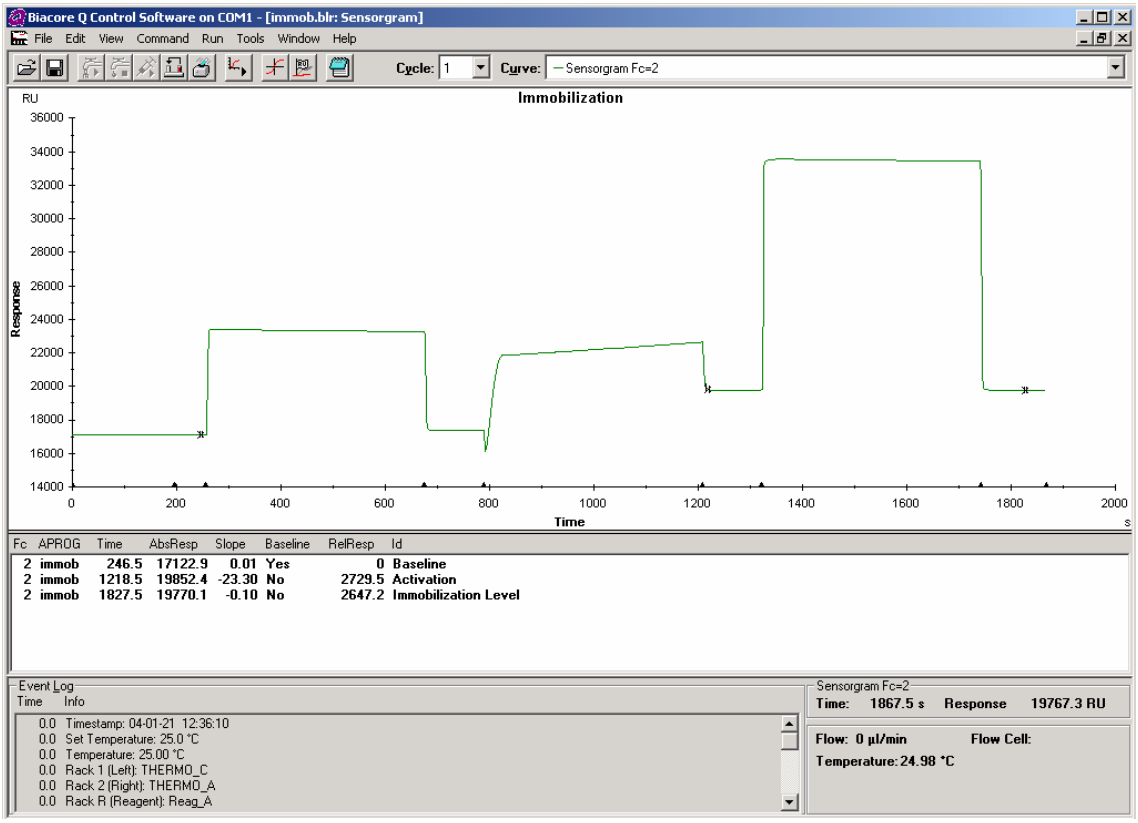
固定化操作実行中は上記ボックスが表示される。

↓



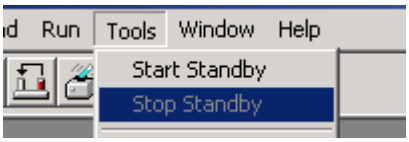
固定化が終了すると、Standby が実行され、固定化量が表示される。ボックス中の **Close** をクリックし固定化操作を終了する。

↓


Biacore Q Control Software on COM1 - [immob.blr: Sensorgram]
File Edit View Command Run Tools Window Help
Cycle: 1
Curve: Sensorgram Fc=2
Immobilization
RU
Response
Time
Fc APROG Time AbsResp Slope Baseline RelResp Id
2 immob 246.5 17122.9 0.01 Yes 0 Baseline
2 immob 1218.5 19852.4 -23.30 No 2729.5 Activation
2 immob 1827.5 19770.1 -0.10 No 2647.2 Immobilization Level
Event Log
Time Info
0.0 Timestamp: 04-01-21 12:36:10
0.0 Set Temperature: 25.0 °C
0.0 Temperature: 25.00 °C
0.0 Rack 1 (Left): THERMO_C
0.0 Rack 2 (Right): THERMO_A
0.0 Rack R (Reagent): Reag_A
Sensorgram Fc=2
Time: 1867.5 s Response 19767.3 RU
Flow: 0 µl/min Flow Cell:
Temperature: 24.98 °C

固定化センサーグラムが表示される。**File** → **Close** でセンサーグラムを閉じる。

↓



↓

Tools → **Stop Standby** をクリックし、Standby を停止する。画面上のセンサーグラムは Close する。

3.1.4　Surface Prep ユニットを用いた分子の固定化

Surface Prep ユニットは、BiacoreQ システムに装着して使用する外付けユニットであり、センサーチップを装着することでフローセルを形成し、マイクロ流路系（IFC）を介さずに固定化をおこなうことができる。
マイクロ流路系には無い化学耐性を持つため、水に難溶性の物質の固定化に有利である。
ただし、Surface Prep ユニットを用いた固定化では、その様子をセンサーグラムとしてモニターすることができない。

Surface Prep ユニットの化学耐性表

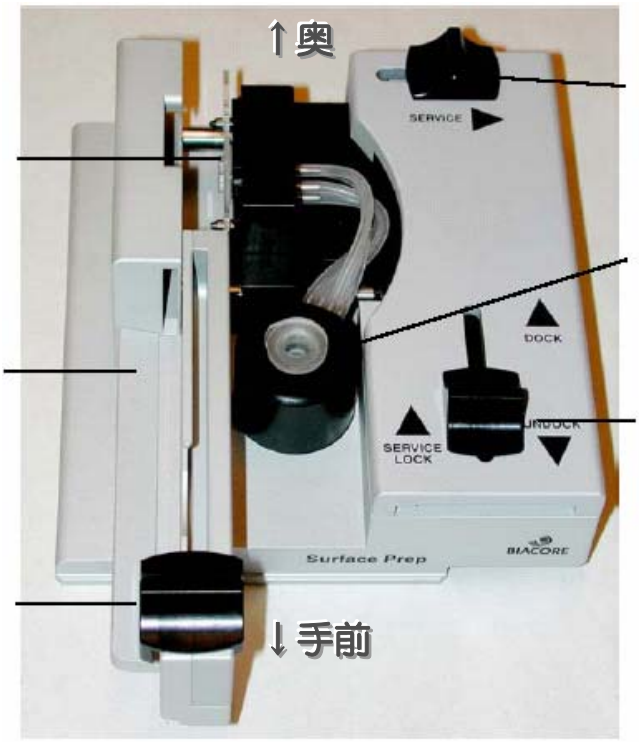
溶液	濃度	耐性
Acetonitrile	100%	使用可
Dimethylfomamide(DMF)	80%	30min
Dimethylsulphoxide(DMSO)	100%	30min
Dioxane	50%	30min
Ethylenediamine	1M（水溶液）	30min
Ethanol	100%	30min
Methanol	100%	30min
3-Methylaminopropylamine	1M（水溶液）	30min
Tetrahydrofuran(THF)	100%	使用不可

以下では VitaminB2 を例に記載する。
＊Surface Prep ユニットを用いて固定化をおこなう場合、あらかじめシステム本体にメンテナンスチップを Dock し、超純水による Prime をおこなう。

Surface Prep ユニットへのセンサーチップの Dock

Surface Prep ユニットへのセンサーチップの Dock は、実験台の上でおこなう。

Surface Prep ユニット各部の名称



・サービススライダー
・インジェクションブロック
・フローセルキャリア
・廃液カバー
・廃液ビーカー
・センサーチップホルダー
・ドッキングスライダー
・センサーチップスライダー

廃液カバーの内側に、蓋を取りはずした廃液ビーカーをセットする。

↓

ドッキングスライダー、センサーチップスライダーが手前まで引かれていることを確認する。

↓

センサーチップホルダーにセンサーチップをセットする。ホルダーに軽く押しつけた状態でセンサーチップスライダーを奥まで押す。これにより、センサーチップカバー内のシートがスライドする。

↓

ドッキングスライダーを奥まで押す。これによりインジェクションブロック・フローセルキャリア部分がセンサーチップに圧着し、Surface Prep ユニットへのセンサーチップの Dock が完了する。

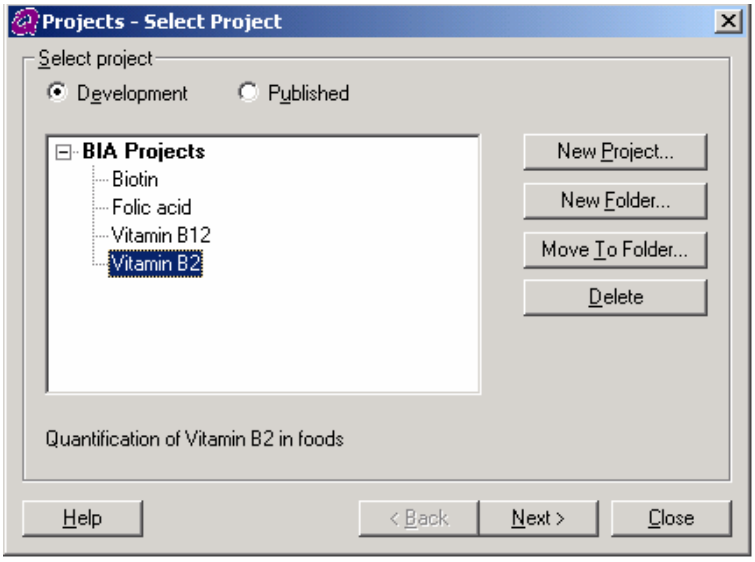
固定化条件の設定

センサーチップを Dock した Surface Prep ユニットを、システム本体の右側にセットする。（この際、Surface Prep ユニットを前後左右に軽く動かし、きちんとセットされていることを確認する。）

↓

Run → Project...をクリックする。

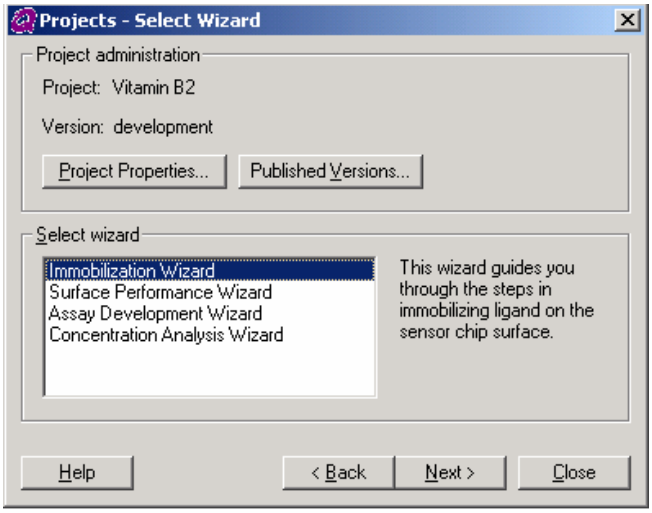
↓



実験系を新規で立ち上げる場合は、BIA Projects フォルダ内に Project フォルダを新たに作成する。（P21Project フォルダの作成を参照。）

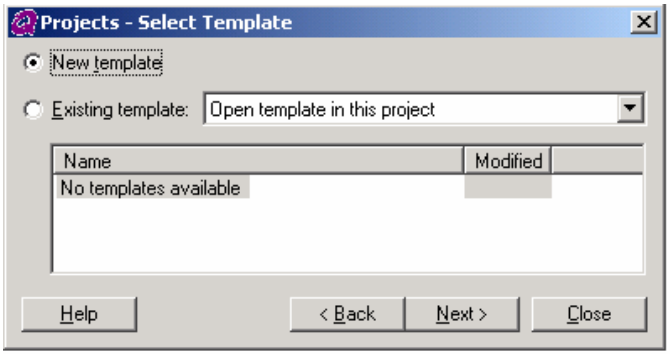
目的のフォルダを選択後、**Next>**をクリックする。

↓



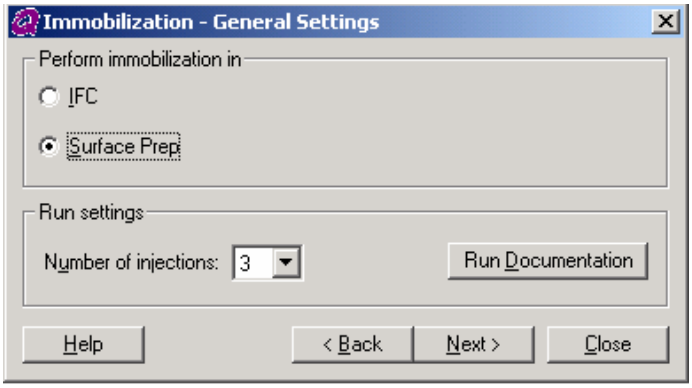
Immobilization Wizard を選択し **Next>**をクリックする。

↓



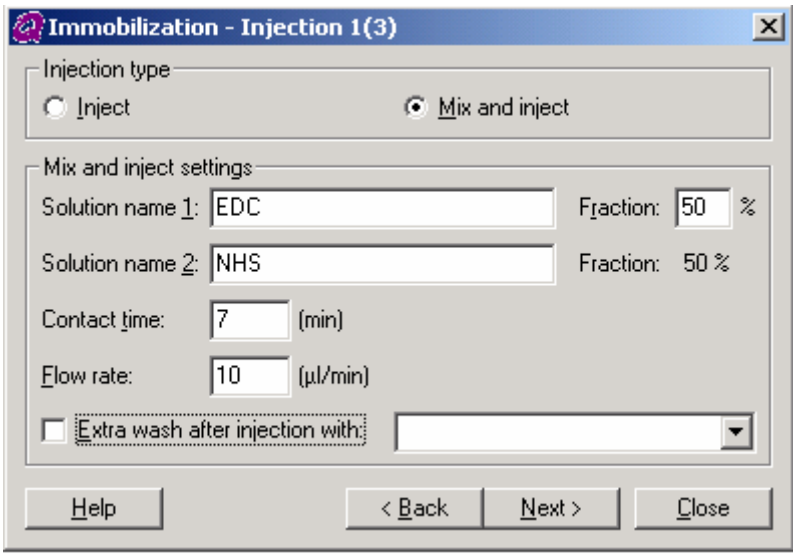
New template を選択し **Next>**をクリックする。

↓



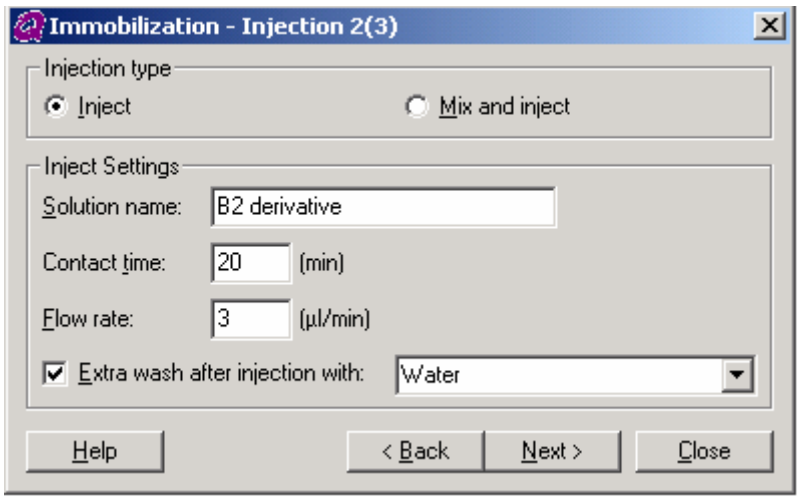
Perform immobilization in で **Surface Prep** を選択し、Run settings で固定化操作中におこなう添加操作の回数を選択する。アミンカップリングの場合、NHS/ EDC 混合溶液、リガンド溶液、ブロッキング溶液の添加をおこなうため、3 を選択する。**Next>**をクリックする。

↓



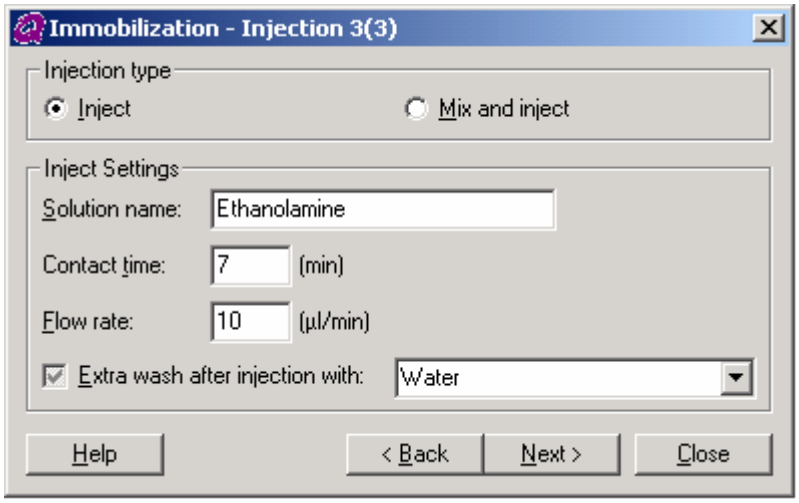
活性化に関するパラメータの設定をおこなう。活性化もしくは EDC および NHS を混合後添加するため、Injection Type は **Mix and inject** を選択する。Fraction（EDC および NHS の混合割合）は 50%、Contact time を 7 分、Flow rate を 10 µl/min に設定する。**Next>**をクリックする。
必要に応じて、Extra wash after injection with:をチェックし、洗浄溶液名を入力する。

↓



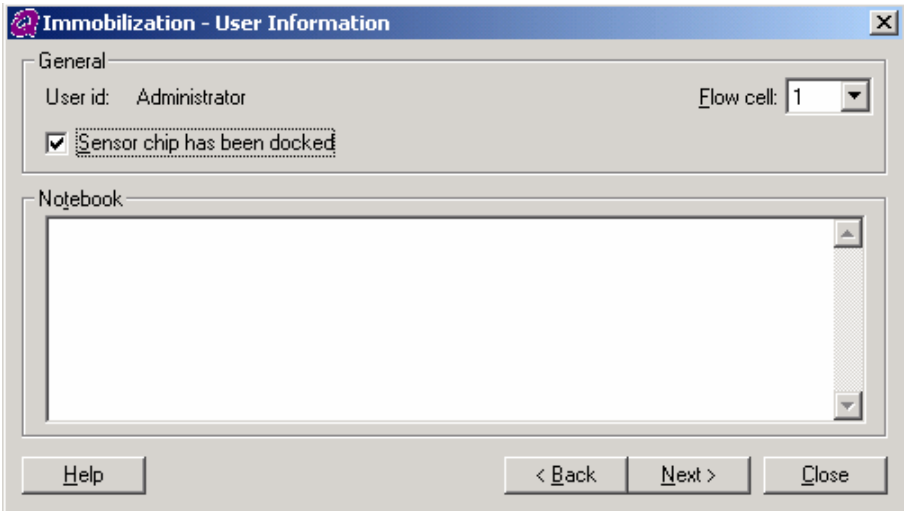
Solution name:に固定化分子の名前を入力する。Contact time と Flow rate を設定する。
必要に応じて、Extra wash after injection with:をチェックし、洗浄溶液名を入力する。

↓



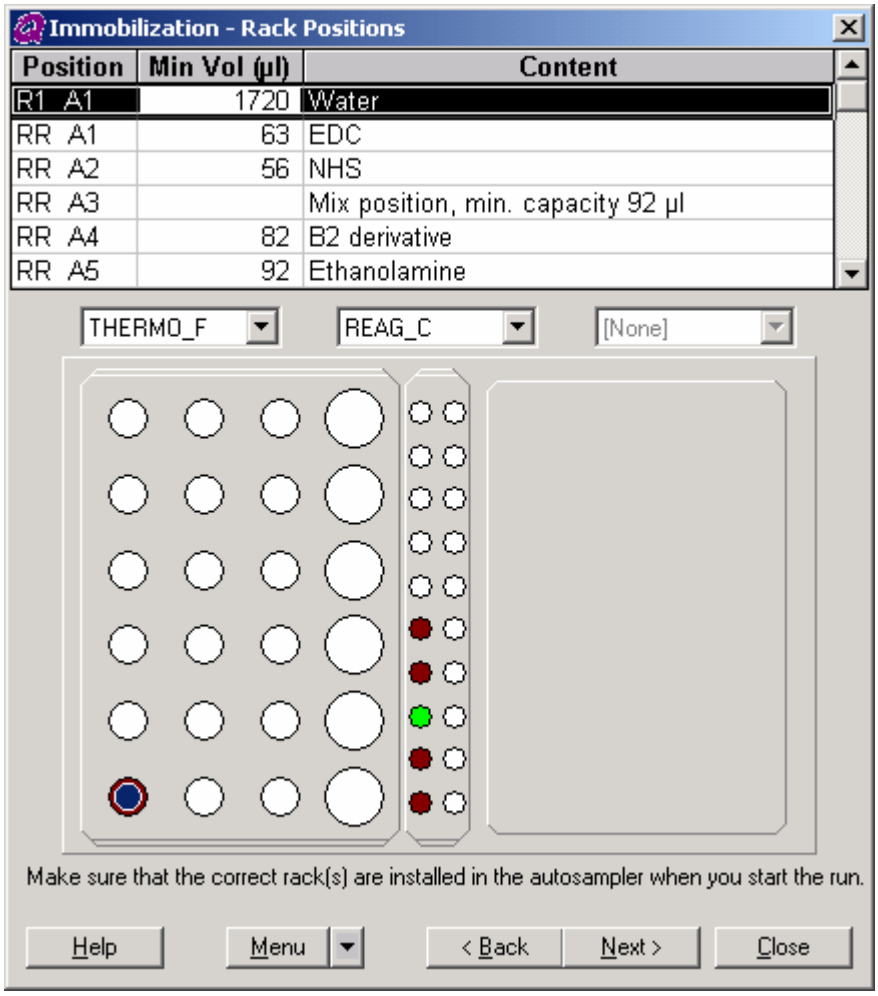
エタノールアミンの添加に関するパラメータの設定をおこなう。Contact time を 7 分、Flow rate を 10 µl/min に設定する。

↓



固定化するフローセル番号を選択し Sensor chip has been docked をチェックする。**Next>**をクリックする。(必要に応じて Notebook にメモを書き込む。)

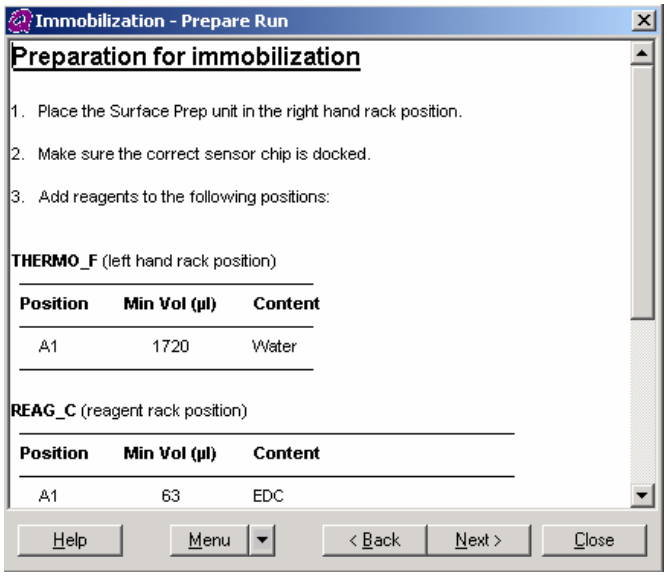
↓



画面とシステム本体にセットしているラックが同一であることを確認する。試薬は Min Vol（ µl）カラムの、必要量以上をセットする。

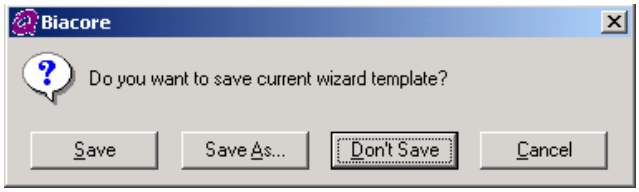
必要に応じて試薬の位置を変更することが可能である。その場合、使用するバイアルによって必要量が変わるため、位置変更後、必ず Min Vol（ µl）カラムの必要量を確認する。

↓


Immobilization - Prepare Run
Preparation for immobilization
1. Place the Surface Prep unit in the right hand rack position.
2. Make sure the correct sensor chip is docked.
3. Add reagents to the following positions:
THERMO_F (left hand rack position)
Position Min Vol (µl) Content
A1 1720 Water
REAG_C (reagent rack position)
Position Min Vol (µl) Content
A1 63 EDC
Help
Menu
< Back
Next >
Close

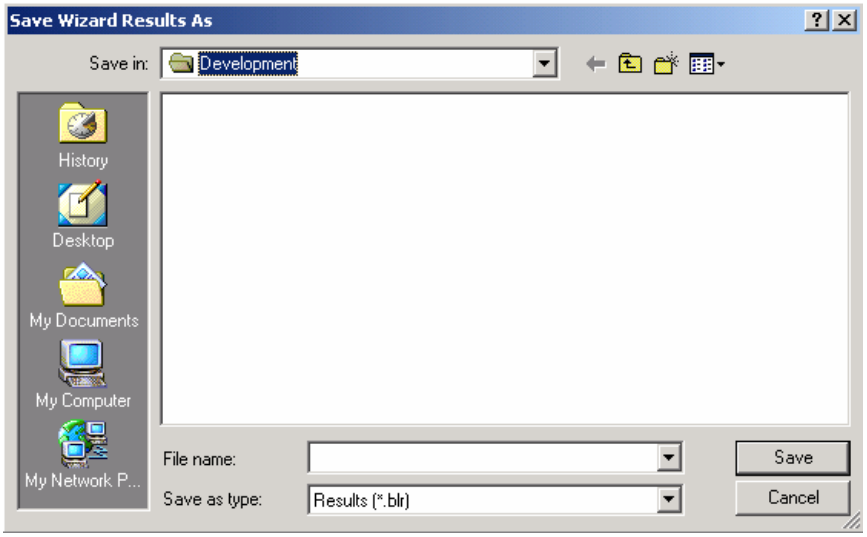
試薬の量、位置の確認をおこなう。**Next>**をクリックしていき、全画面確認する。最後の画面になると Next>ボタンが Start に変わる。**Start** をクリックする。

↓



測定条件をテンプレートとして保存する場合は、**Save As...**を用いる。保存先は Development（C : / BIA Projects /目的の Project フォルダ/ Immobilization / Development ）を選択する。保存をしない場合には **Don't Save** をクリックする。

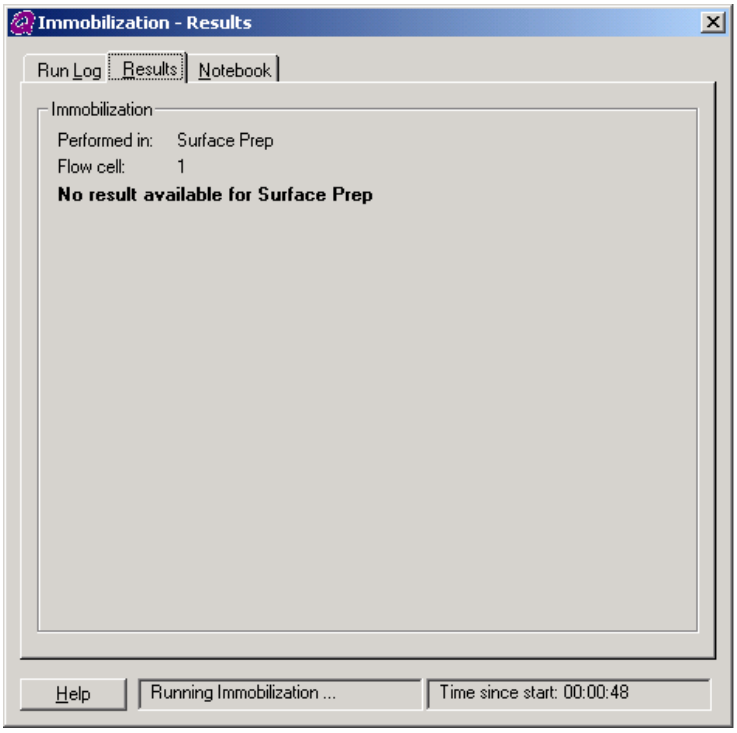
↓



結果の保存先を設定し、ファイル名を入力して **Save** をクリックする。Development（C : / BIA Projects /目的の Project フォルダ/ Immobilization / Development ）を選択する。

↓

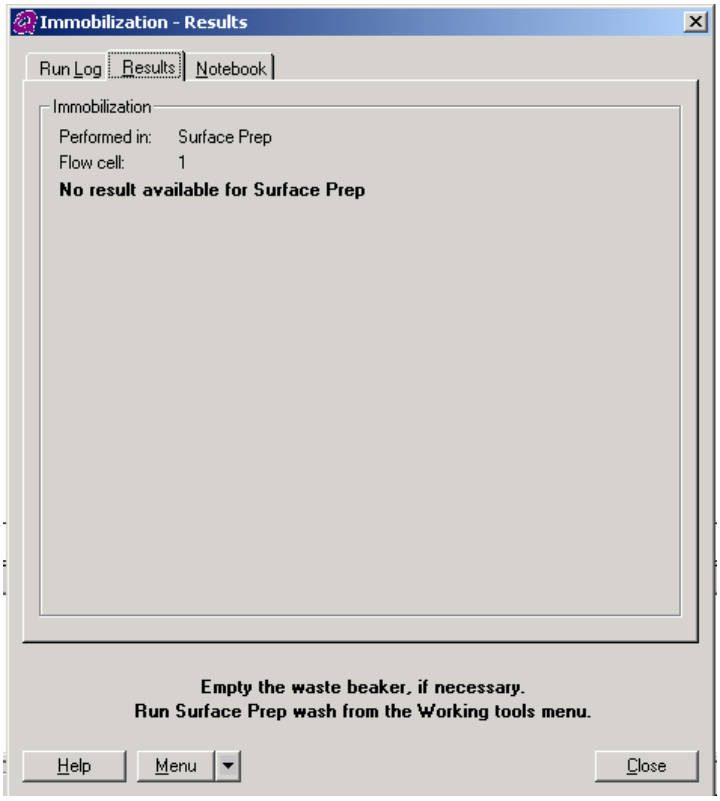
固定化操作が実行される。



固定化操作時、上記ボックスが表示される。

↓

（重要）
実行後に Wizard を強制終了する場合には、キーボードの
Ctrl（左下）＋ Break（右上）
を同時に押す。



固定化が終了後、上記ボックスが表示される。**Close** をクリックし固定化操作を完了する。

↓

Surface Prep ユニットを洗浄する（88 ページ参照）。

本体より Surface Prep ユニットを取りはずす。センサーチップを Undock し、廃液ビーカーにたまった廃液を捨てる。

3.2 濃度測定系構築のための条件検討

3.2.1 マニュアル操作による結合の確認と再生条件検討

濃度測定を開始する前に、固定化済みセンサーチップに既知濃度の定量分子もしくは検出分子などのリガンド結合分子を添加し、結合の確認をおこなう。この段階で、検量線濃度範囲や再生条件についても同時に検討する。

結合分子の調製

不溶性の粒子等は遠心などで除去し、できるだけランニング緩衝液で希釈する。濃度はアフィニティーや分子量にもよるが、およそ数十 ng/ ml～数百 µg/ ml でおこなう。

再生溶液

結合分子を強制的に解離させる操作を再生（Regeneration）操作という。再生操作は、以下の条件を満たしていることが必要である。

①固定化分子の活性を失わないこと
②定量分子もしくは検出分子を完全に解離させること
③固定化分子がセンサーチップ表面から遊離しないこと

通常、再生溶液として、以下の種類のものがある。

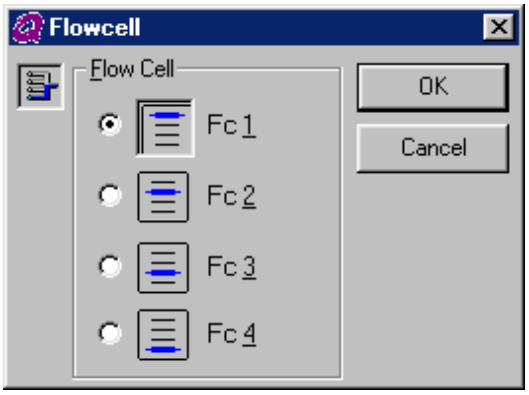
- 高塩濃度溶液
- pH を変化させる溶液（酸性溶液あるいはアルカリ溶液）
- キレート剤（多価カチオン依存性反応の場合）
- 界面活性剤
- 有機溶媒
- 変性剤

再生は、固定化分子の活性の低下を抑制するために、30 秒～1 分間の短い添加が望ましい。

結合分子、再生溶液をラックにセットする。

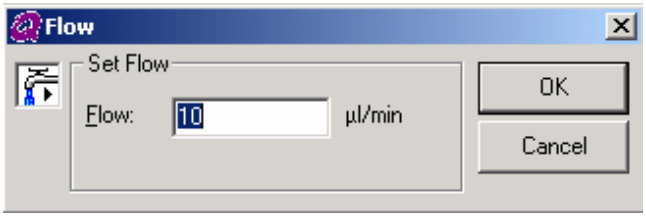
↓

あるいは **Run** → **Run Sensorgram...**をクリックする。



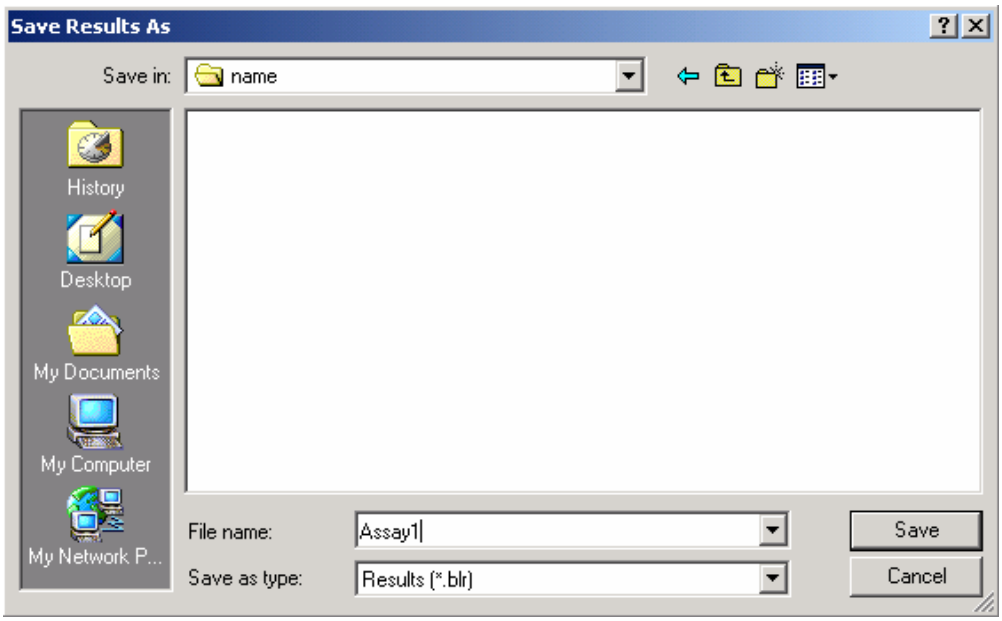
固定化したフローセルの選択をおこない、**OK** をクリックする。

↓



流速（1～100 µl/min）を入力後、**OK** をクリックする。ここでは 10 µl/min を用いる。

↓



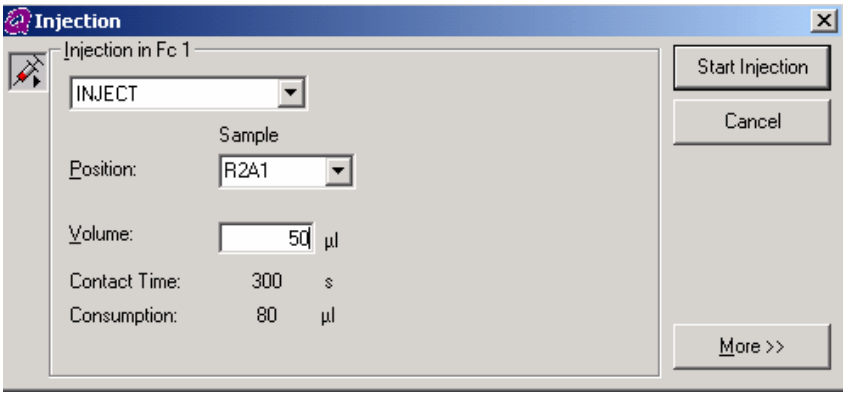
結果の保存先を設定する。C：＼BIA Uses＼（個別のフォルダ）に移動後、ファイル名を入力し、**Save** をクリックする。

↓

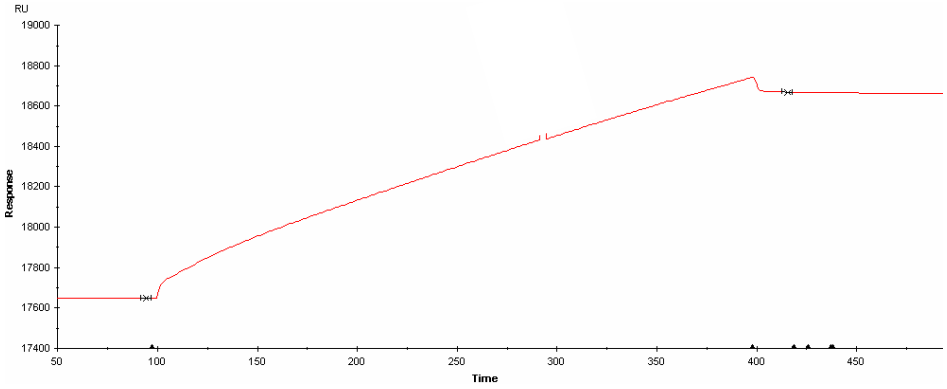
（センサーグラムが表示され測定が開始される。）

↓

あるいは **Command → Inject...**をクリックする。



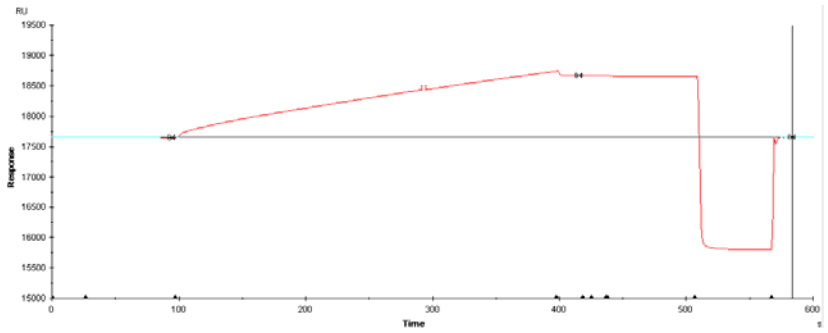
サンプルのポジションおよび添加容量を入力し、**Start Injection** をクリックする。結合分子濃度は、特異性を確認する上で、また再生条件を至適化する上で、高めの濃度（1µg/ ml～10µg/ ml）を用いるのが望ましい。



↓

（結合量確認のため、結合分子添加前 10 秒程度から添加終了後 30 秒～2 分程度の時間でレポートポイントを取る。）

引き続き、 あるいは **Command → Inject...**をクリックし、再生溶液を添加する。通常 1 分以内程度の添加時間を推奨する。再生条件を検討する場合は、固定化分子にとってマイルドな条件から試す。



↓

（再生の確認のため、再生溶液添加終了後 30 秒程度で、レポートポイントを取る。）
再生後のベースラインが、結合分子添加前の高さに戻る条件を検討する。レスポンスがベースラインから始まり、結合・解離・再生で元のベースライン付近に戻るまでを Biacore での実験の 1 サイクルとする。

↓

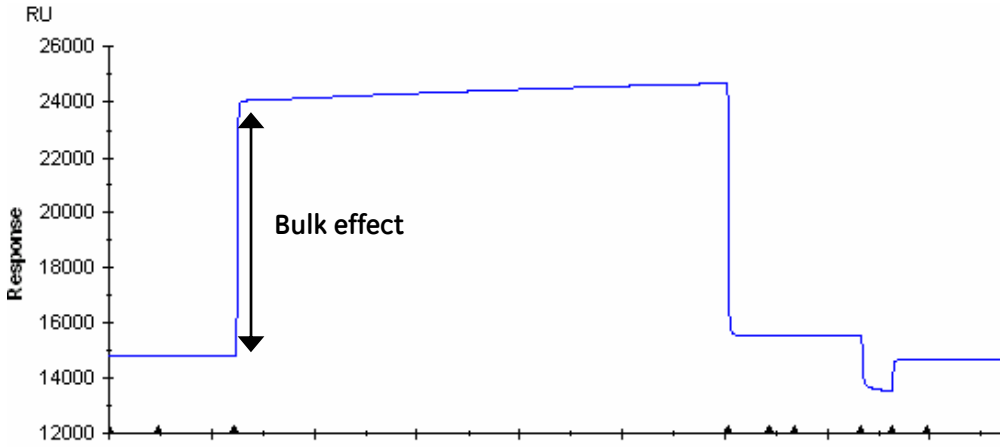
引き続きサンプルを添加して測定する場合には、1 サイクルごとに画面を切り替えて測定するのが望ましい。**Run → Start New Cycle** をクリックし、新しいサイクルをスタートさせ、上記と同様に、結合分子と再生溶液を添加する。
Start New Cycle コマンドを使用する場合、各サイクルのデータは同一ファイル内に別サイクルとして保存される。

↓

あるいは **Run → Stop Sensorgram** をクリックし、測定を終了する。

溶液効果（bulk effect）

サンプル溶液とランニング緩衝液の組成の違いがある場合、溶液効果(bulk　effect)が発生し、センサーグラムのランニング緩衝液とサンプル溶液の切り替え点が不連続になる。

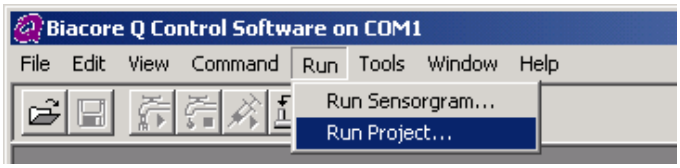


3.2.2　Wizard を用いた再生条件の至適化

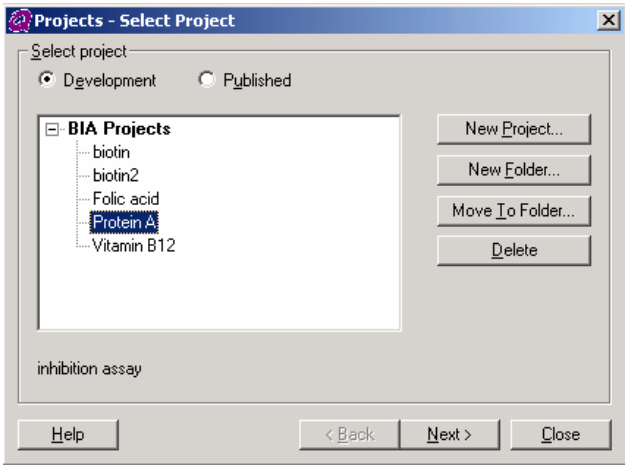
マニュアル操作で決定した再生条件を用いて、複数回の再現性テストをおこない、再生条件と固定化分子の安定性の評価をおこなう。

Run → Run Project...をクリックする。

↓

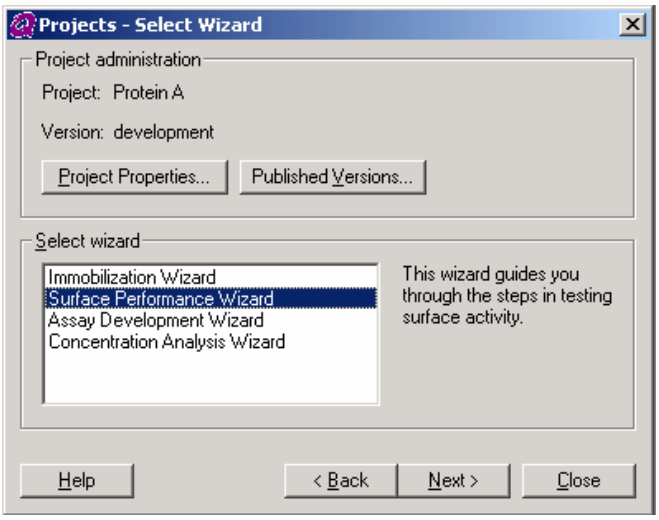


↓



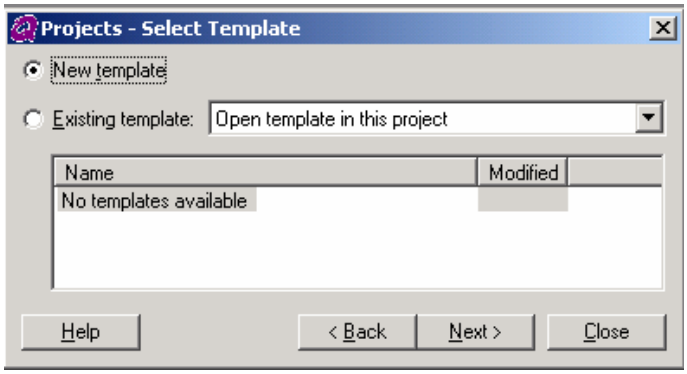
目的の Project フォルダを選択後、**Next >**をクリックする。（新規にフォルダを作成する場合は P21Project フォルダの作成を参照。）

↓



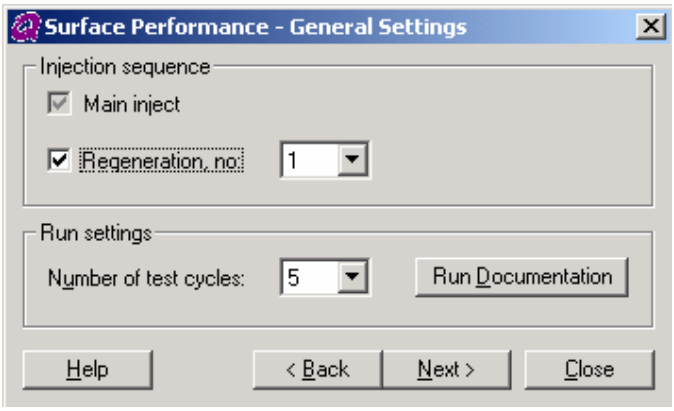
Surface Performance Wizard を選択し、**Next >**をクリックする。

↓



New template をマークし、**Next>**をクリックする。

↓

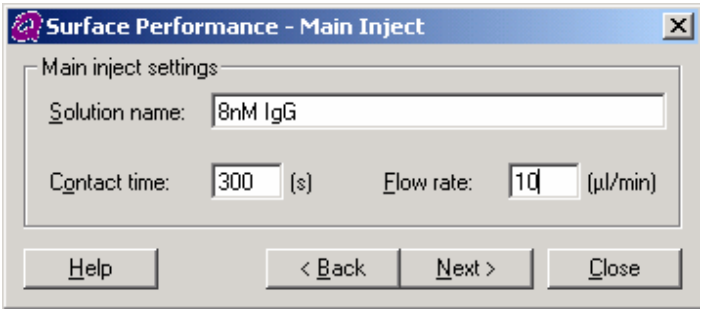


Injection sequence 中の **Regeneration,no:**にチェックを入れ、1 サイクル中の再生溶液の添加回数を選択する。

さらに、Run settings には、再現性の試験回数を選択し、**Next>**をクリックする。

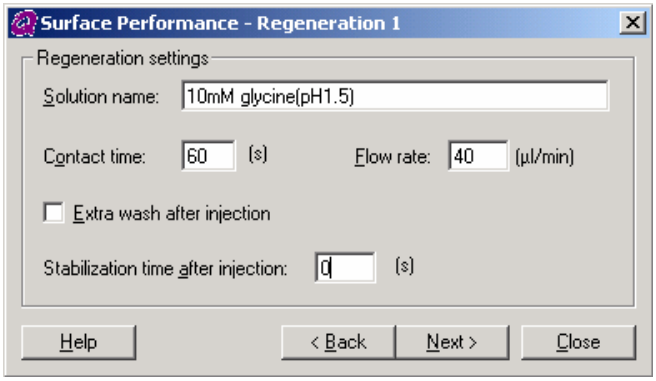
再現性試験回数は 5 回以上が望ましい。

↓



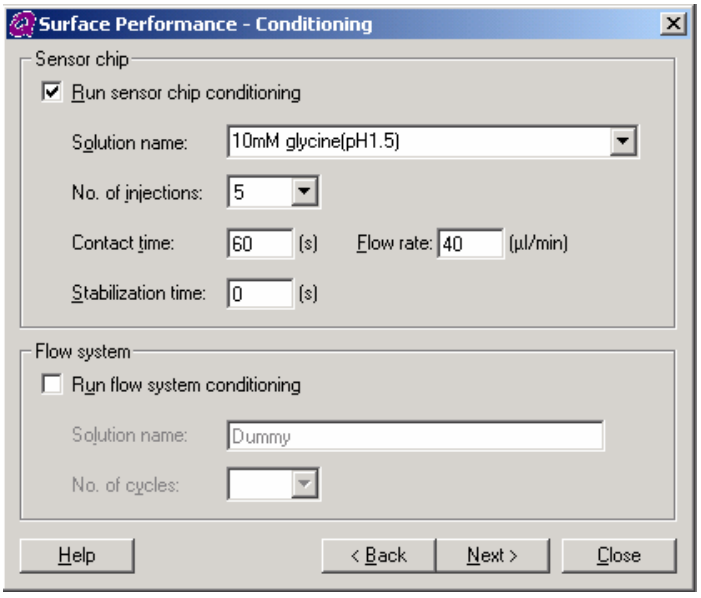
結合分子の添加条件を入力し、**Next>**をクリックする。

↓



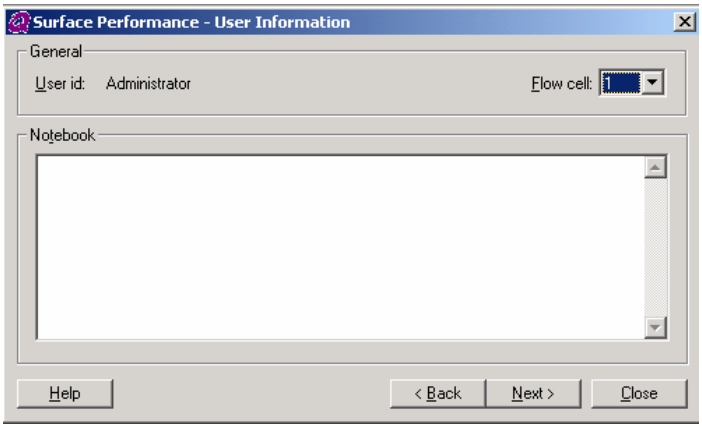
再生溶液の添加条件を入力し、**Next>**をクリックする。

↓



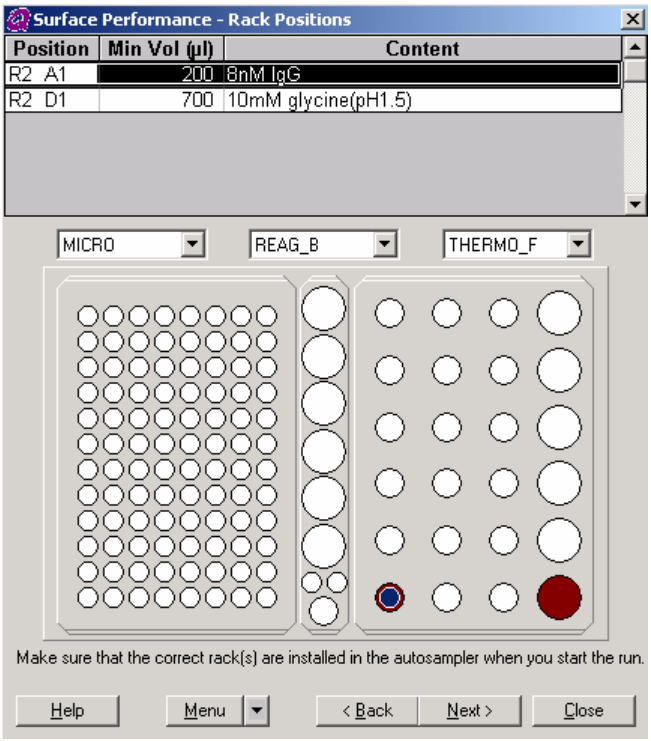
この Wizard の実行前に、再生溶液によるセンサーチップ表面のコンディショニングをおこなう場合は **Run sensor chip conditioning** を選択し、再現性の試験で使用する再生条件を入力する。**No. of injection** には、コンディショニング回数を選択する。
ダミーサンプル（0 濃度サンプル等）による流路のコンディショニングをおこなう場合には、**Run flow system conditioning** を選択して溶液名を入力し、コンディショニング回数を選択して **Next>**をクリックする。

↓



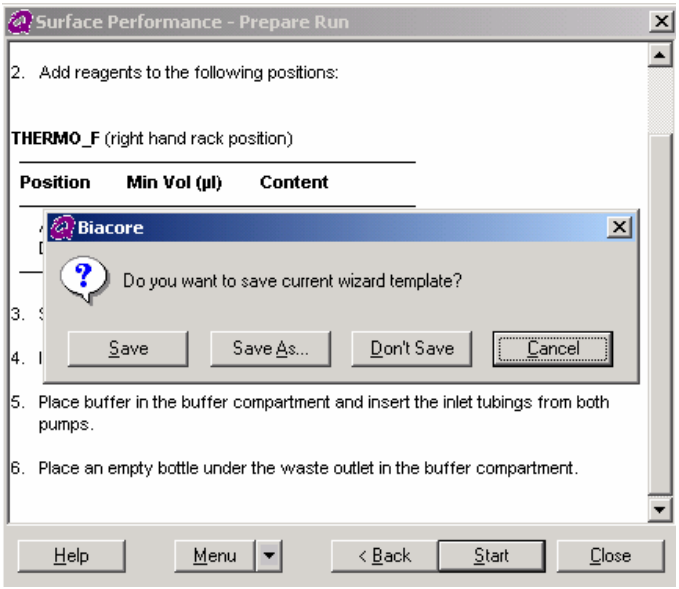
再現性テストをおこなう固定化済フローセルを選択し、**Next>**をクリックする。

↓



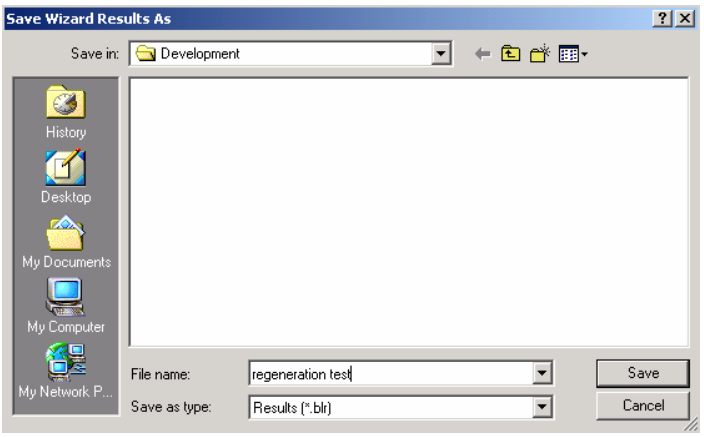
必要サンプルを確認してセット後、**Next>**をクリックする。

↓



試薬の量、位置の確認画面を **Start** > すると、測定条件テンプレート保存画面が表示される。
必要に応じて保存する。

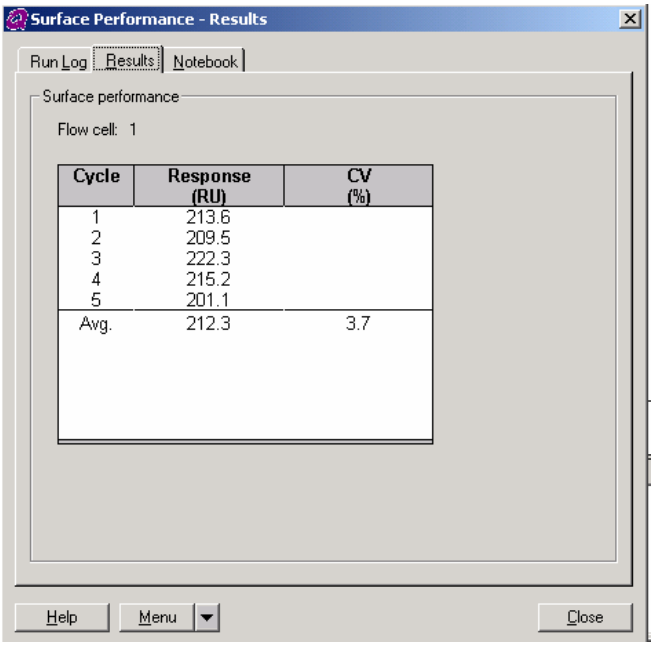
↓



結果の保存先を設定し、ファイル名を付け、**Save** をクリックすると、テストが開始される。

↓

測定が開始されると結合分子の結合量が順次表示される。

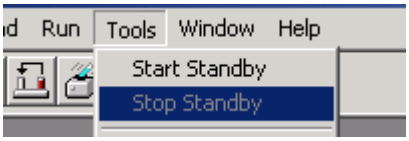


すべてのサイクルが終了後、全サイクルの平均値と CV 値（%）が、Results タブ画面に表示される。

Close をクリックし、結果の画面を閉じる。

↓

Standby が実行されている。



Tools → Stop Standby をクリックして Standby を停止する。

↓

センサーグラムは close する。

3.3　濃度測定

3.3.1　Wizard を用いた濃度測定

マニュアル操作により決定した条件を用いて Wizard で測定する。
1）直接法と 2）阻害法に分けて解説する。

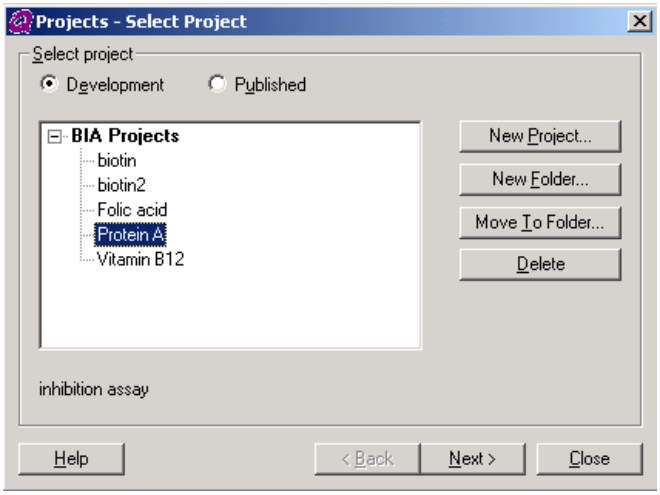
1）直接法

定量分子に対して親和性を持つ分子を固定化したセンサーチップに、定量するサンプルを添加し、得られる結合レスポンスから濃度を決定する方法。

Run → Run Project…をクリックする。

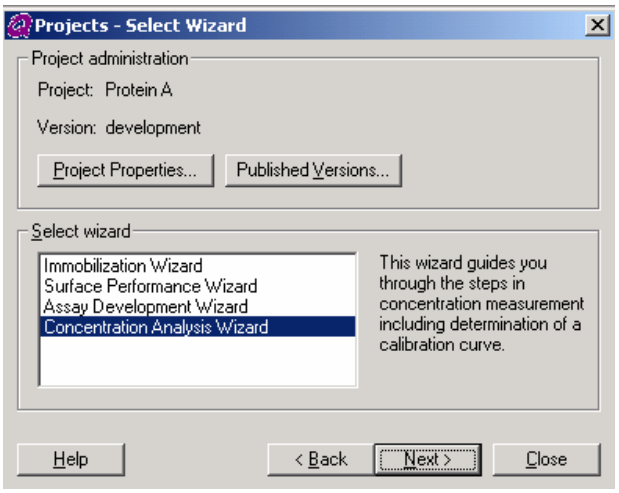
↓

↓



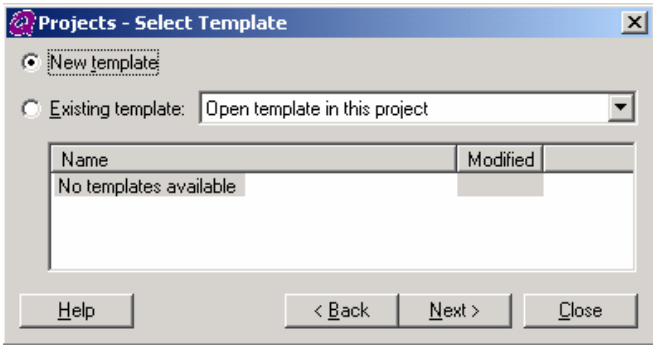
目的の Project フォルダを選択後、**Next >**をクリックする。

↓



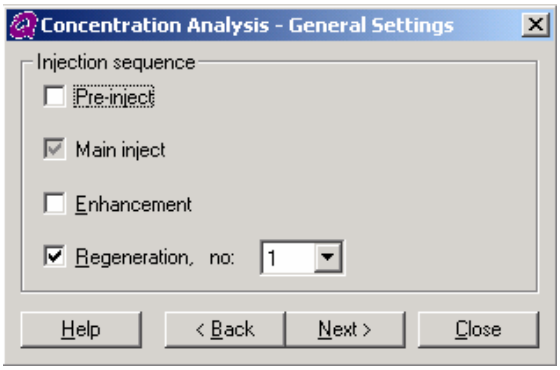
Concentration Analysis Wizard を選択し、**Next>**をクリックする。

↓



New template を選択し **Next>**をクリックする。

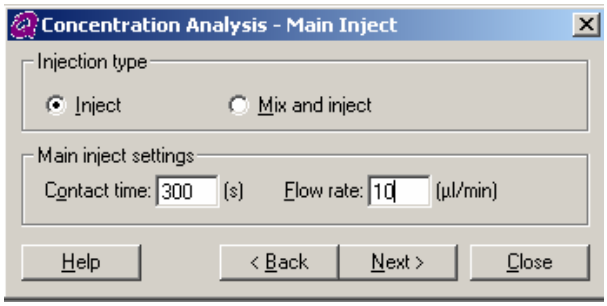
↓



測定 1 サイクル中でおこなう添加の設定をする。サンプルの添加である Main inject はすでに選択されている。**Regeneration** を選択し、予備実験で決定した再生溶液の添加回数を入力し、**Next>**をクリックする。(例えば、定量分子に対して結合する分子を、センサーチップ表面に直接ではなく、あらかじめ固定化しておいたキャプチャー分子にトラップさせる場合は Pre-Inject をクリックする。また、分子量が小さめの結合分子のレスポンスを増強さ

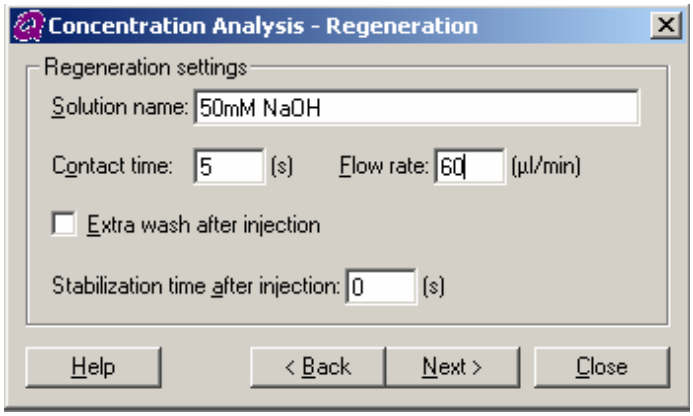
せる目的で結合分子添加に引き続き、結合分子に結合する高分子を添加する場合は Enhancement を選択する。）

↓



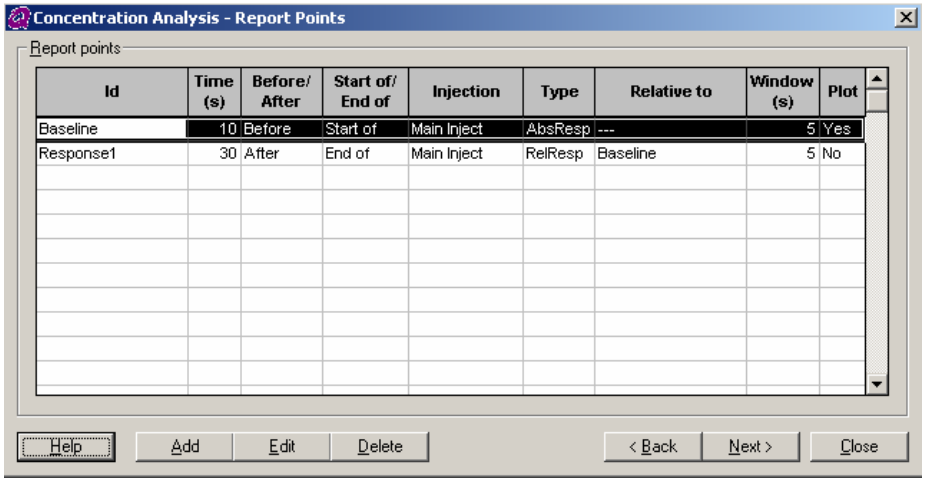
サンプルおよび検量線作成用定量分子の添加に関するパラメータの設定をおこなう。
Injection type に **Inject** を選択し、サンプルの添加条件を設定して、**Next >**をクリックする。

↓



予備検討で決定した再生条件を入力し、**Next >**をクリックする。

↓

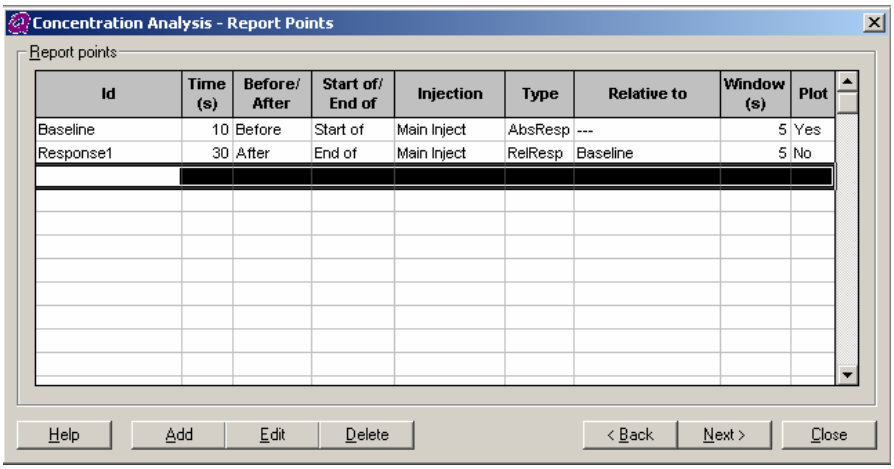


レポートポイントの設定をおこなう。設定の方法は P53 レポートポイントの設定・変更を参照のこと。**Next >**をクリックする。

レポートポイントの追加・変更

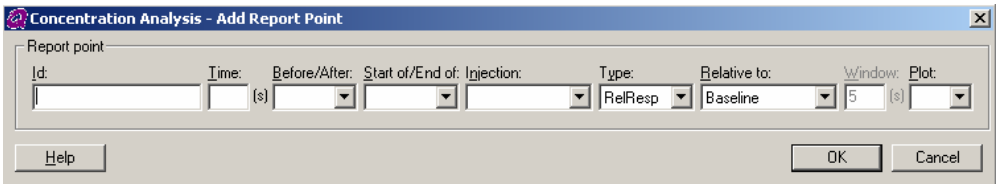
結合量を数箇所で確認するためにレポートポイントを追加するケースが多い。

カーソルを新しいカラムに移動する。



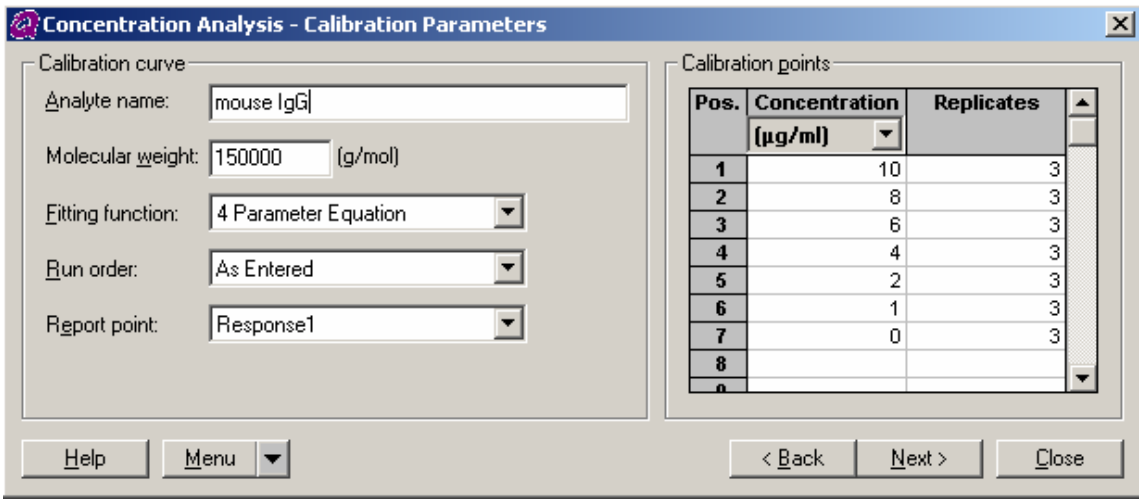
Add をクリックする。

↓



必要事項の入力選択後、**OK** をクリックすると新しい Report point が追加される。設定の変更は Id をダブルクリックすることで変更できる。

↓



Calibration curve で検量線の作成に関するパラメータを設定する。

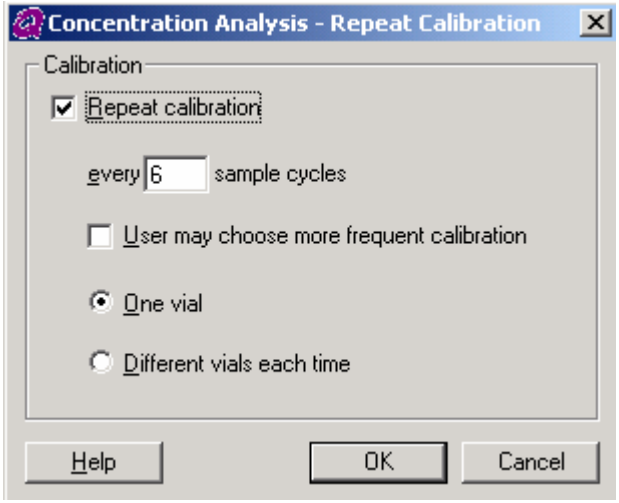
Calibration curve 中のパラメータの説明を下記に示す。

Analyte name	：定量分子名
Molecular weight	：定量分子量
Fitting function	：検量線のカーブフィッティングに使用するモデル
Run order	：Calibration solution の測定順序
Reporting point	：結合量を評価するレポートポイントの ID

次に、Calibration points 中に Calibration solution の濃度を入力する。Replicate は 1 濃度の繰り返し測定回数。この繰り返し測定回数は 1 濃度について連続測定をおこなう。全段階濃度を 1 シリーズとして、1 シリーズの測定を複数回繰り返す場合は、Replicate に 1 を入力し、Concentration に測定順序に応じた濃度を入力する。（例：10、8、6、4、2、1、0、10、8、6、4、2、.....）設定後 **Next>**をクリックする。

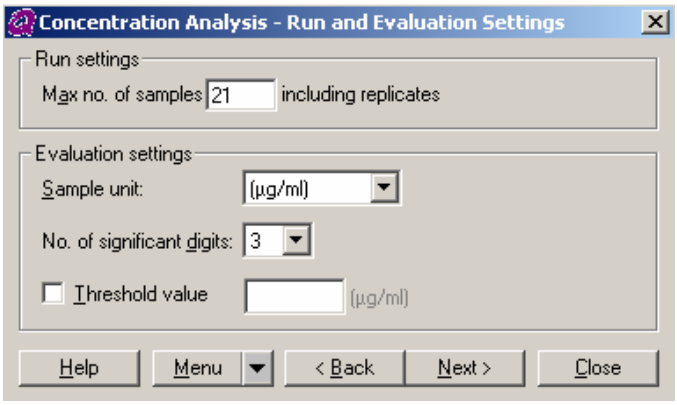
検量線の測定頻度

Calibration parameters ダイアログボックスの下方にある **Menu** をクリックすると Repeat calibration ボックス中で検量線の作成頻度を設定することができる。



Repeat calibration を選択し、検量線の作成頻度を入力する。また、同一の Calibration dilutionw を複数回添加する場合、Calibration solution を、同一バイアルにセットすることができる。同一にする場合は **One vial** を選択し、別々にする場合は **Different vials each time** を選択する。尚、最後のサンプル測定後には検量線は作成されない。最後のサンプル測定後にも確認のための検量線を作成したい場合、検量線作成頻度と照らし合わせ、測定サンプルの最後に測定が不必要な Buffer 等のダミーサンプルをおくとよい。

↓



このテンプレートを使用した測定に関する設定をおこなう。Run settings 中の Max no. of samples に、最大測定サンプル数を入力する。検量線用結合分子の測定サンプル数は含まない。

Evaluation settings 中のパラメータの説明を下記に示す。

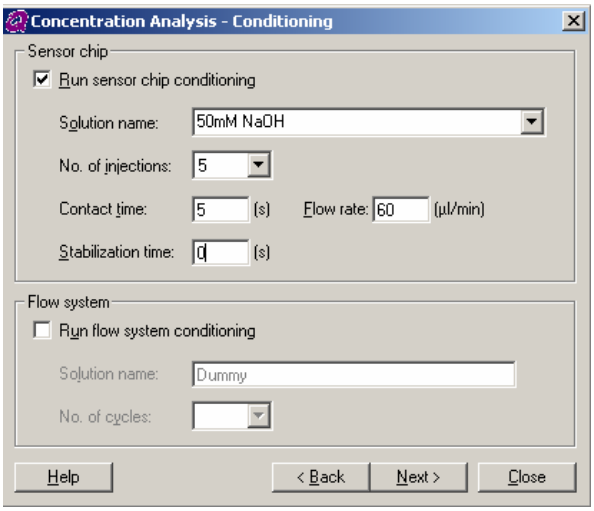
Sample unit　　：結果の表示に使用する濃度単位

No. of significant digits　　：結果で表示される数値の有効桁数

Threshold value は基準値を設定する場合に使用する（測定結果を設定した基準値に対して評価し、negative／positive が追加表示される）。

設定後、**Next>**をクリックする。

↓



測定を始める前のコンディショニングに関する設定をおこなう。

Sensor chip 中の **Run sensor chip conditioning** をチェックし、センサーチップ表面のコンディショニング条件（再生条件）を入力する。

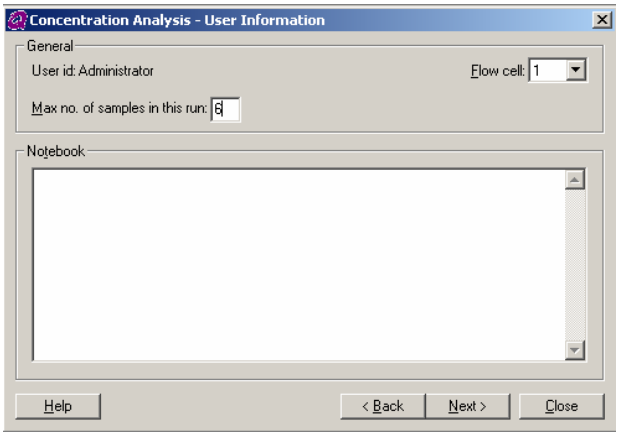
パラメータの説明を下記に示す。

Solution name　：再生溶液（通常 2～5 回）
No. of injections　：添加回数
Contact time　：接触時間
Flow rate：流速
Stabilization time　：再生溶液添加後のベースラインの安定化時間

ダミーランを実施する場合は、Flow system 中の Run flow system conditioning をチェックし、流路系のコンディショニング条件を入力する。パラメータの説明を下記に示す。3 回程度実行することが望ましい。

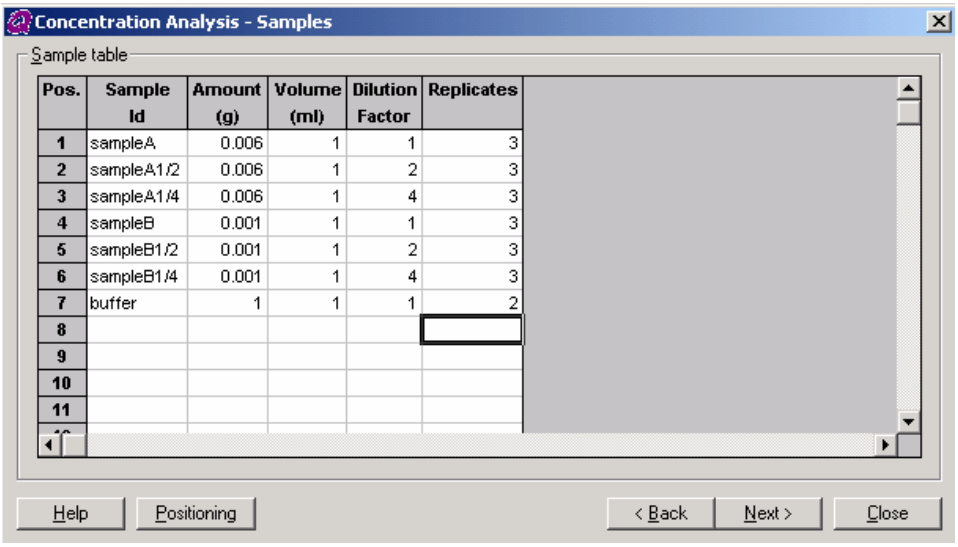
Solution name　：0 濃度サンプル等
No. of cycles　：実行サイクル数（通常 2～10 回）
設定後 **Next>**をクリックする。

↓



Flow cell には測定に使用する固定化フローセルを選択し、Max no. of samples in this run には測定最大サンプル数を入力する。（必要に応じて Notebook にメモを書き込む。）**Next>**をクリックする。

↓



サンプルに関する情報を Sample Table に入力する。

各カラムについての説明を下記に示す。

Sample Id　　：サンプル名

Amount（g）　　：サンプルの由来物質の質量

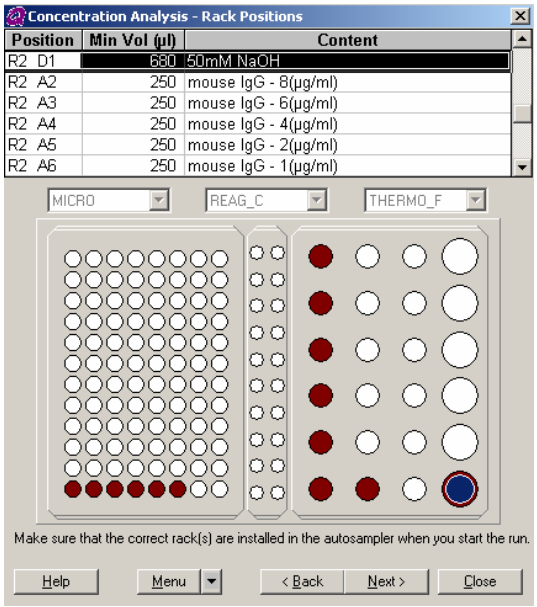
Volume（ ml）　　：サンプルの由来物質の容量

Dilution Factor　　：希釈倍率

サンプルの由来物質の質量または容量を入力することにより、抽出希釈倍率を自動的に計算した測定結果を得ることができる。希釈倍率を Dilution に入力することにより希釈倍率を掛けた測定結果を得ることができる。

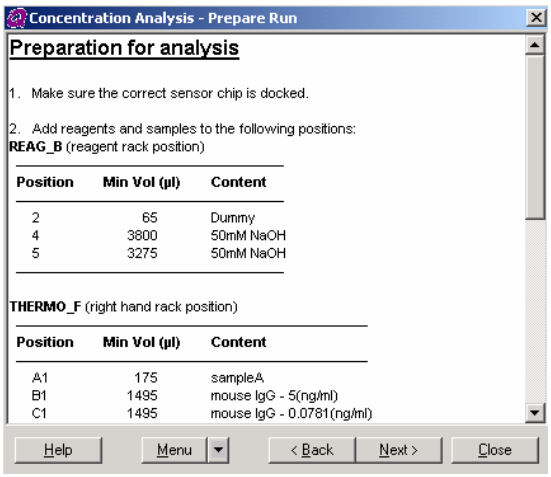
設定後 **Next>**をクリックする。

↓



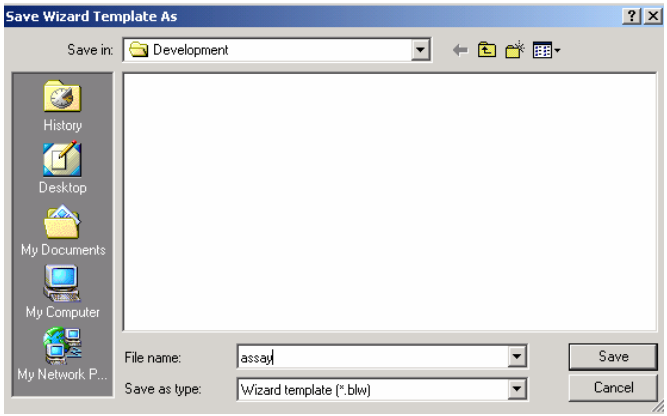
画面とシステム本体にセットしているラックが同一であることを確認する。試薬は Min Vol（ µl）カラムの、必要量以上をセットする。
必要に応じて試薬の位置を変更することが可能である。その場合、使用するバイアルによって必要量が変わるため、位置変更後、必ず Min Vol（ µl）カラムの必要量を確認する。
Next>をクリックする。

↓


Concentration Analysis - Prepare Run
Preparation for analysis
1. Make sure the correct sensor chip is docked.
2. Add reagents and samples to the following positions:
REAG_B (reagent rack position)
Position Min Vol (µl) Content
2 65 Dummy
4 3800 50mM NaOH
5 3275 50mM NaOH
THERMO_F (right hand rack position)
Position Min Vol (µl) Content
A1 175 sampleA
B1 1495 mouse IgG - 5(ng/ml)
C1 1495 mouse IgG - 0.0781(ng/ml)
Help
Menu
< Back
Next >
Close

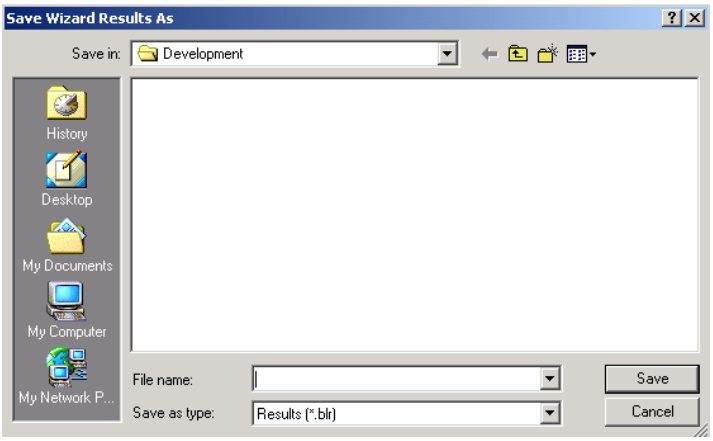
試薬の量、位置を **Next>**をクリックしてすべて確認する。最後の画面で Next>ボタンが Start ＞に変わる。**Start＞**をクリックする。

↓



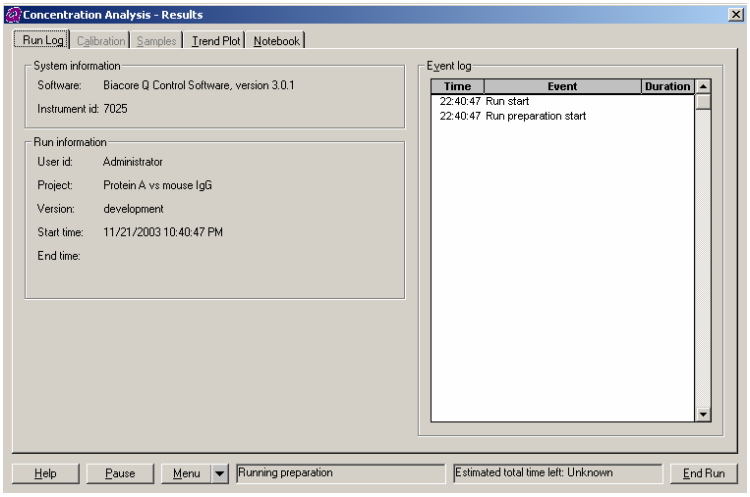
測定条件を Wizard テンプレートとして保存する場合、保存先は、Development（C : / BIA Projects / 目的の Project フォルダ/Concentration Analysis / Development ）を選択する。

↓



結果の保存先を設定し、ファイル名を付け、**Save** をクリックする。

↓

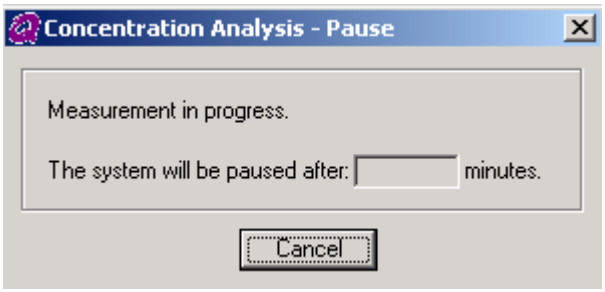


濃度測定が開始される。

測定の一時停止、プログラムの停止

一時停止

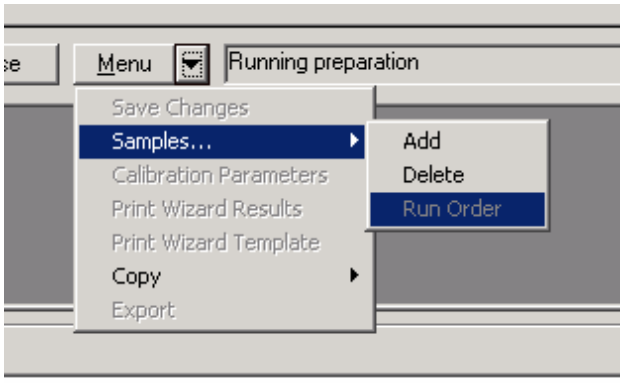
画面左下の Pause をクリックすることで測定を一時停止できる。その時点で測定中のサイクルが終了次第、Standby 状態になり、ドアのロックが解除される。最大 8 時間まで待機することができる。



測定の停止

画面右下の **End Run** をクリックすると、実行中のサイクルの測定をもってすべての測定を停止することができる。

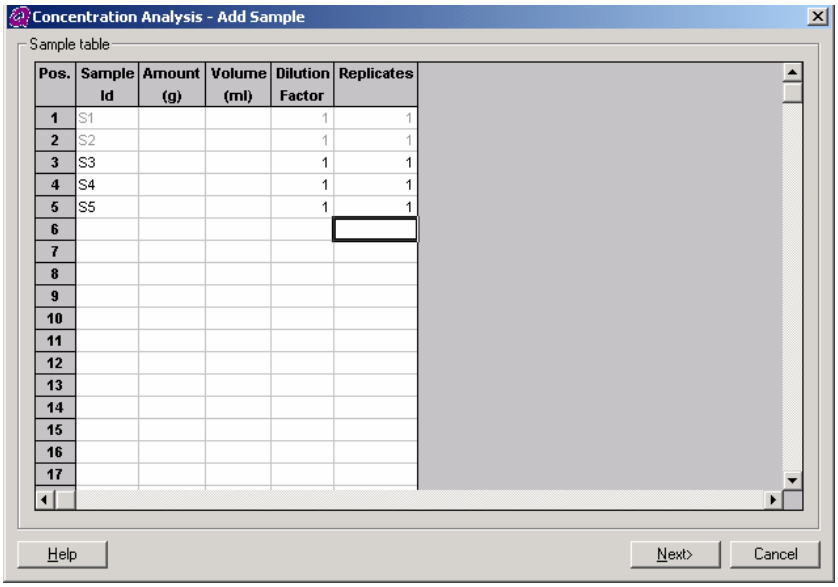
サンプルの追加、削除、測定順序の変更



画面左下の **Menu** の中の **Samples...**をクリックすると、以下のコマンドがある。

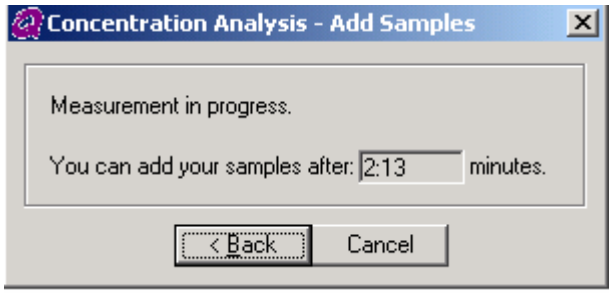
Add	サンプルの追加
Delete	サンプルの削除
Run Order	測定順序の変更

サンプルの追加



追加サンプルを入力後、**Next** で進む。

↓



現在測定中のサイクルが終了するまでの時間が表示される。現在測定中のサイクルが終了すると、Standby 状態になり、ドアロックが解除する。

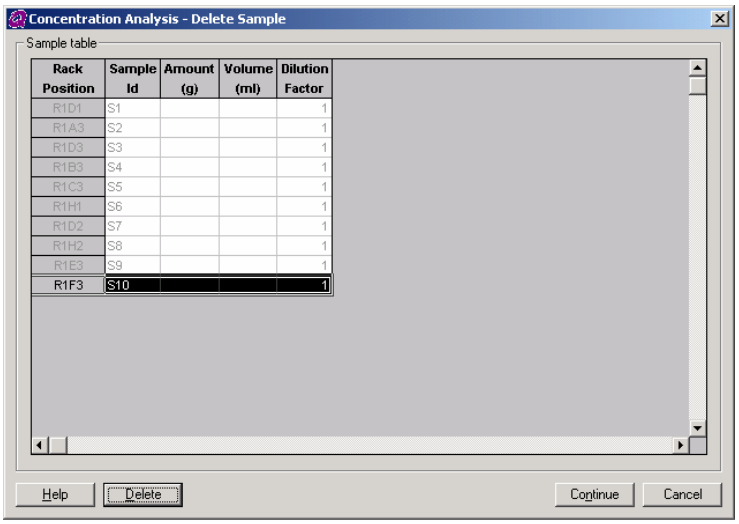
↓

サンプル入力ウインドウが表示される。追加サンプルのポジションを指定してサンプルをセットする。**Next** で進む。

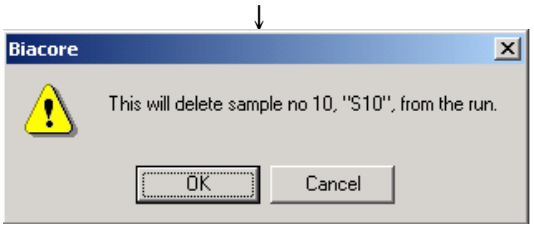
↓

サンプルポジション確認ウインドウが表示される。確認後、**Continue** をクリックする。Standby が終了し、測定が再開する。

サンプルの削除

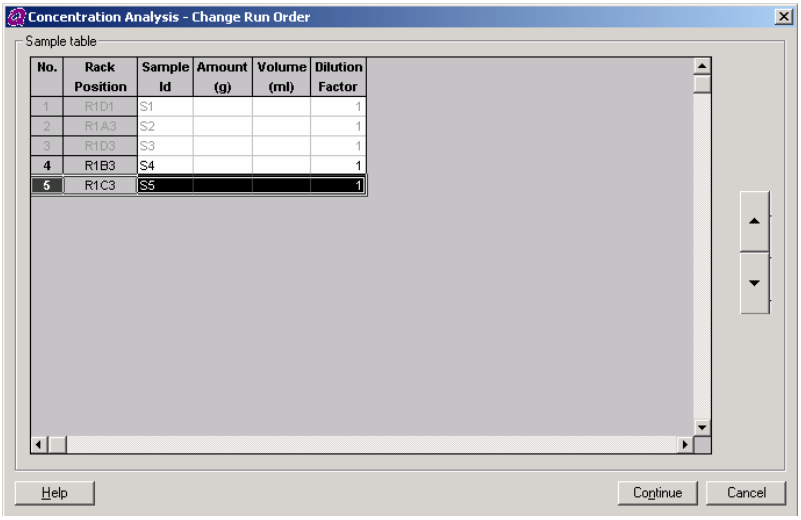


削除するサンプルをクリックする。
Delete をクリックする。



確認ウインドウが表示される。**OK** をクリックする。

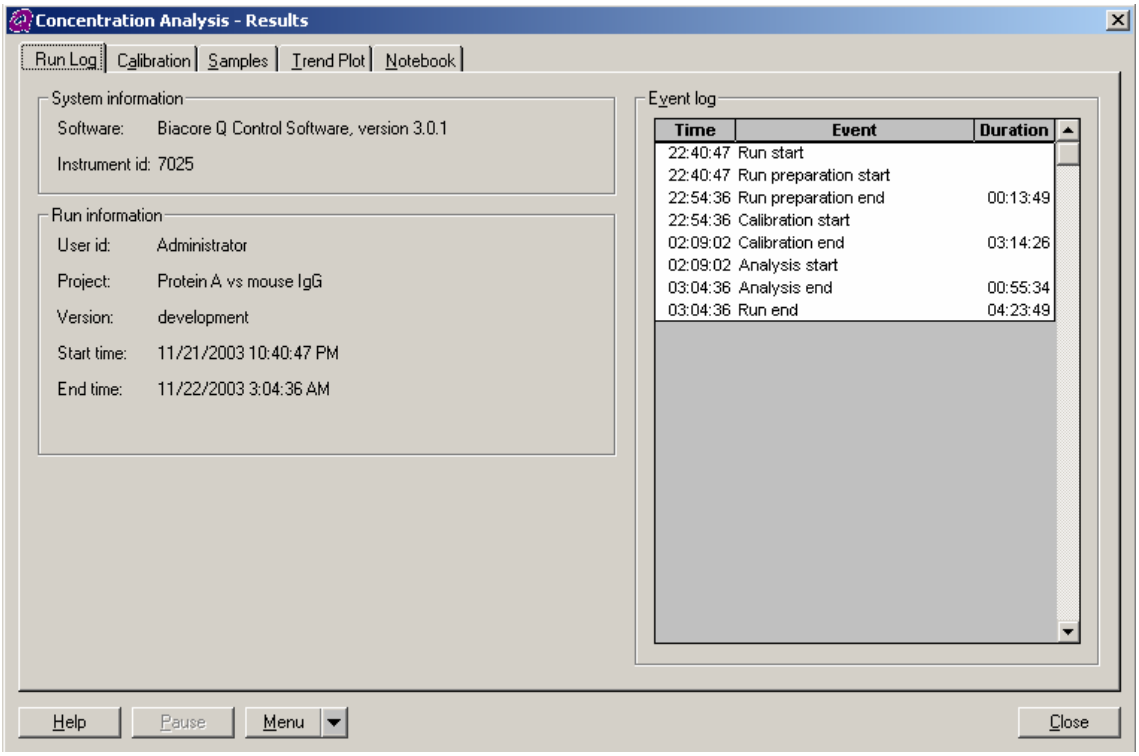
測定順序の変更



順序を変更したいサンプルをクリックする。ウインドウ右側にある、 をクリックして、サンプル測定順序の変更をおこなう。変更後、**Continue** をクリックする。

↓

測定が終了すると、下記ボックスに各種結果が表示される。ボックス上方のタブをクリックし、画面を切り替える。

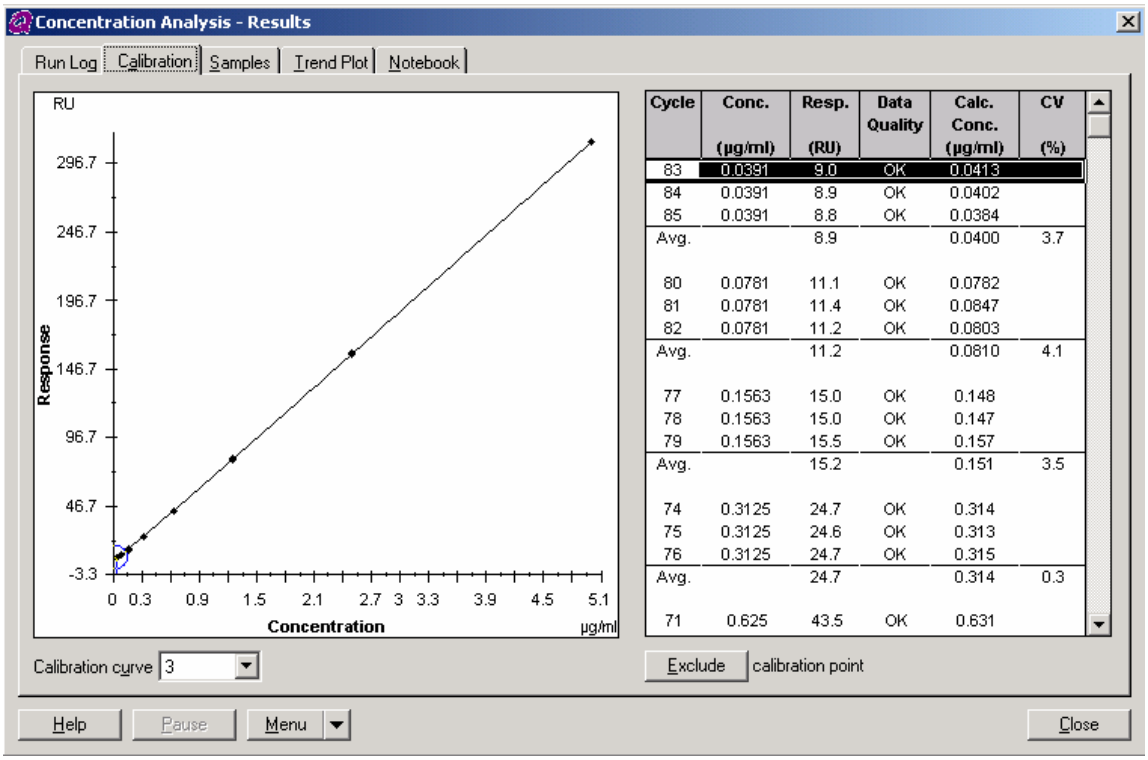


Run Log タブには下記の情報が表示される。

System information　：システム情報

Run information　：測定の実行に関する情報

Event log　：測定の経時記録



Calibration タブには検量線の結果が表示される。

各カラムの説明を下記に示す。

Cycle　　：測定サイクル番号

Conc.（µg/ ml）　：Calibration Solution 濃度

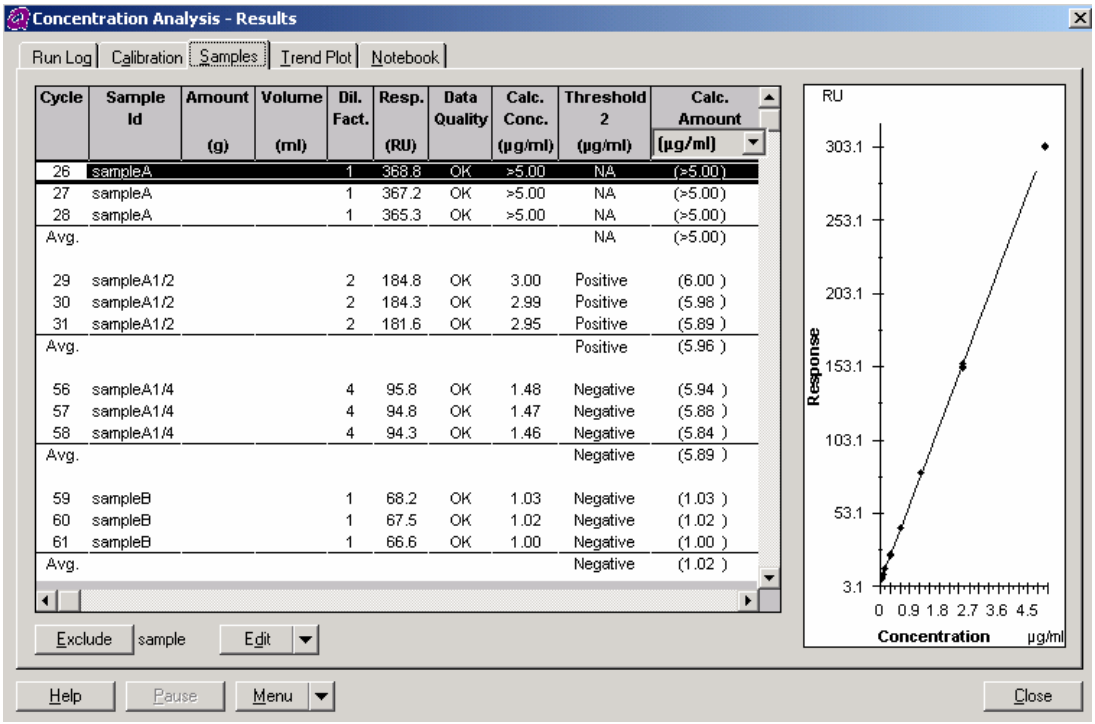
Resp(RU)　　：結合レスポンス

Data Quality　　：データクオリティ（シグナルが正常に測定できているか）

Calc.Conc.　　：検量線から算出した濃度

CV(%)　　：CV 値

エアーの混入などのトラブルにより、全体から著しく逸脱してしまったポイントは、データポイントを選択して右下の **Exclude** をクリックすることで検量線から外すことができる。そのデータポイントは表示が×に変更される。この×を選択すると、Exclude ボタンは Include に変わる。**Include** をクリックすると、再び検量線に戻すことができる。



Sample タブにはサンプル測定結果が表示される。

各カラムの説明を下記に示す。

Cycle　：測定サイクル番号

Sample Id　：サンプル名

Amount(g)　：サンプルの由来物質の質量

Volume(ml)　：サンプルの由来物質の容量

Dil.Fact.　：希釈倍率

Resp(RU)　：結合レスポンス

Data Quality　：データクオリティ（シグナルが正常に測定できているか）

Calc.Conc.　：検量線から算出した濃度

Thersould (µg/ ml)　：Positive/Negative 評価の基準値

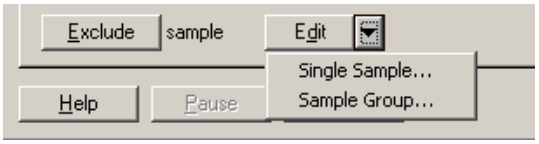
Calc.Amount　：由来物質中の濃度

CV(%)　：CV 値

あらかじめ Wizard 中で Threshold value を設定した場合のみ、Thershold カラムが表示される。

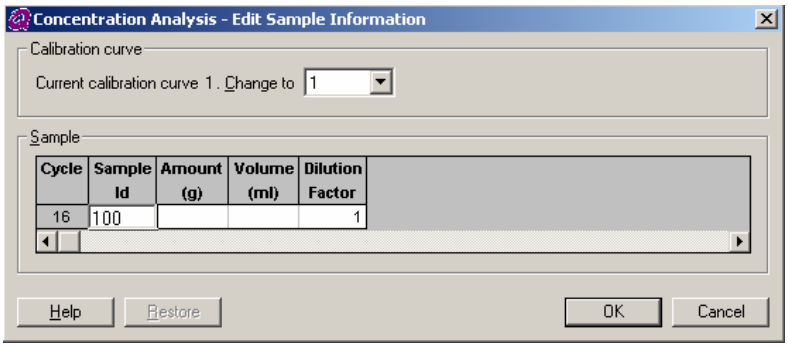
サンプル情報、検量線の変更

測定結果 Sample タブ中の、Sample Id、Amount、Volume、Dil.Fact.などのサンプル情報を変更することができる。また、検量線を複数測定している場合、濃度算出に使用する検量線を変更することができる。



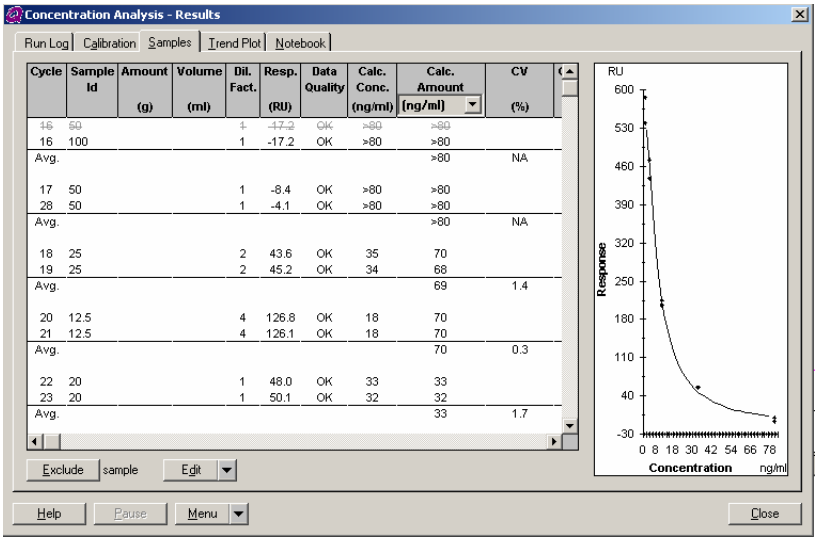
Sample タブ中の下方にある Edit の をクリックする。Single Sample...を選択すると、Sample タブ中で選択しているサンプルのサンプル情報と、検量線を変更することができる。Sample Group...を選択すると、検量線を変更することができる。

↓

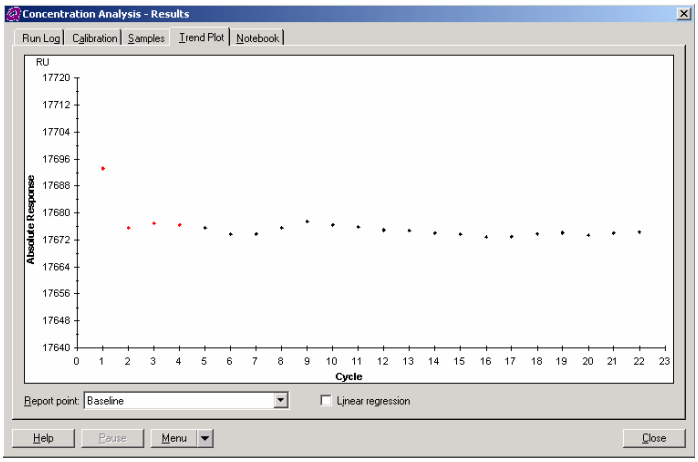


変更事項を入力し、OK をクリックする。

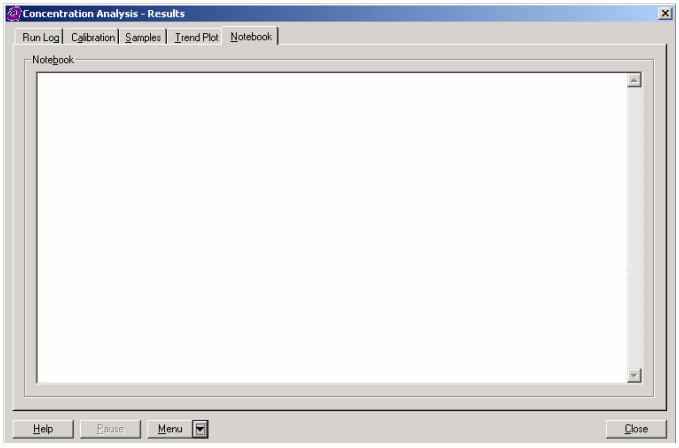
↓



訂正の記録が残り、変更された結果が表示される。

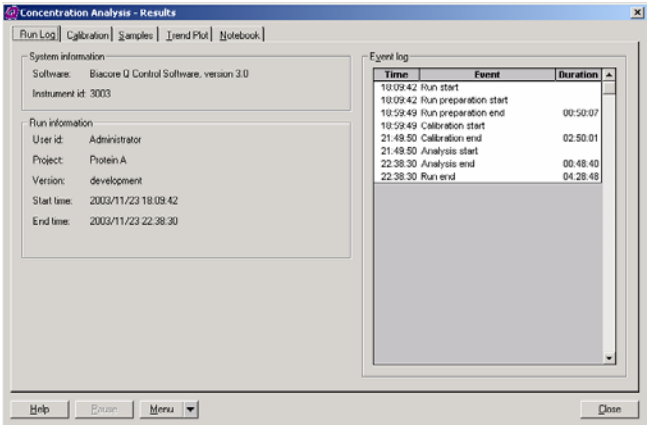


Trend Plot タブにはサイクルごとに記録したレポートポイントのプロットが表示される。左下の Report point のプルダウンメニューで表示するレポートポイントを変更できる。ポイント中、コンディショニングサイクルは赤、測定サイクルは黒で表示される。



Notebook タブにはメモを任意に入力することができる。このタブに入力したメモ内容は随時変更可能である。

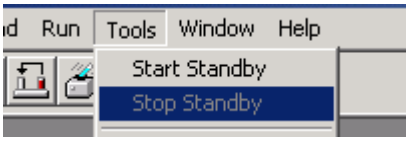
↓



Close をクリックし、測定を終了する。

↓

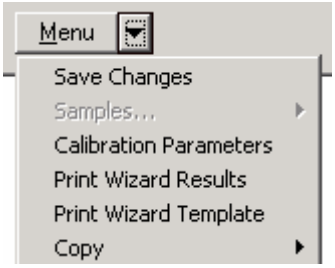
Standby が実行されている。



Tools → Stop Standby をクリックし、Standby を停止する。画面上のセンサーグラムは Close する。

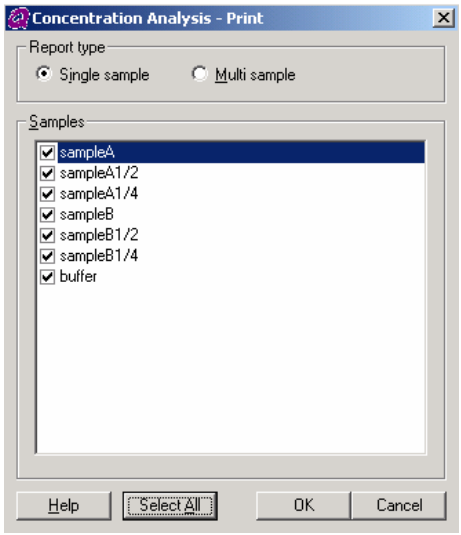
測定結果の印刷

Results ボックス下方にある **Menu** をクリックする。



Print Wizard Results をクリックする

↓



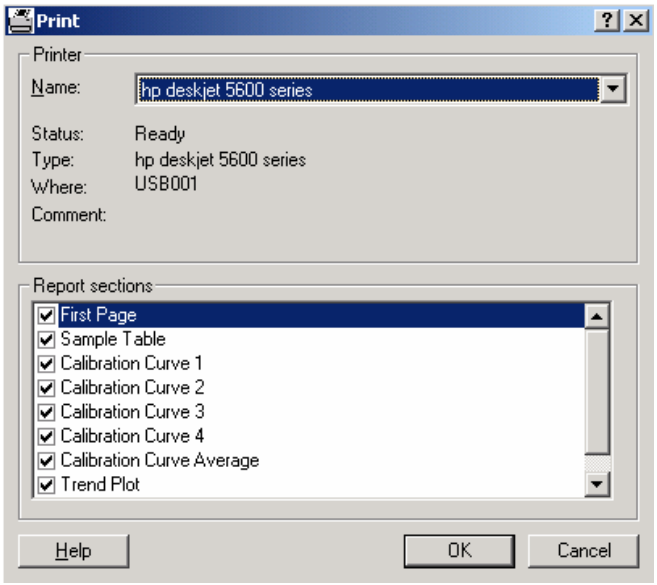
Report type を選択する。

Single sample：Samples 中で選択した各サンプルとその繰り返し測定分に対して、個別セットのレポートを印刷する。

Multi sample: Samples 中で選択した全サンプルに対して 1 セットのレポートを印刷する。

Samples の中で、情報を印刷したいサンプルを選択する。
Select All をクリックすると、全サンプルを選択することができる。

↓



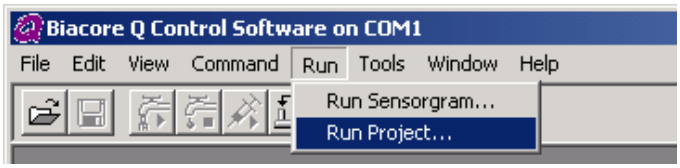
Report sections 中で印刷したい項目を選択することができる。

2）阻害法

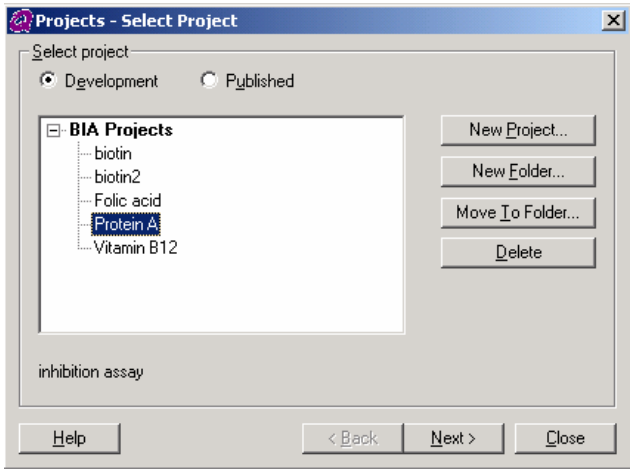
定量分子もしくはその誘導体を固定化したセンサーチップに、定量分子に対して親和性を持つ分子（検出分子）と定量分子の混合液を添加する。未反応の検出分子を定量することで、定量分子の濃度を誘導する。

Run → Run Project…をクリックする。

↓

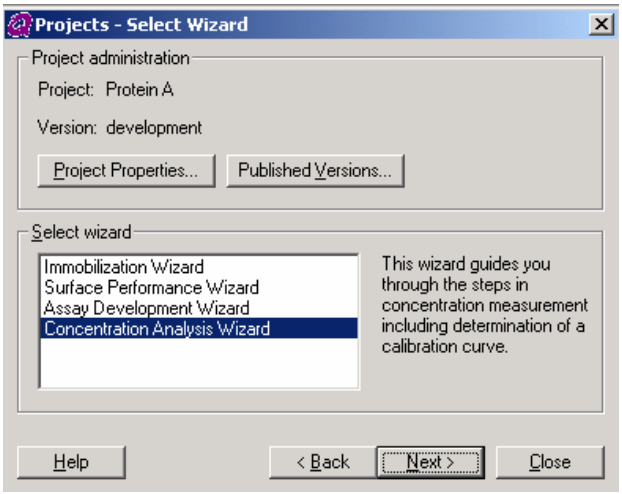


↓



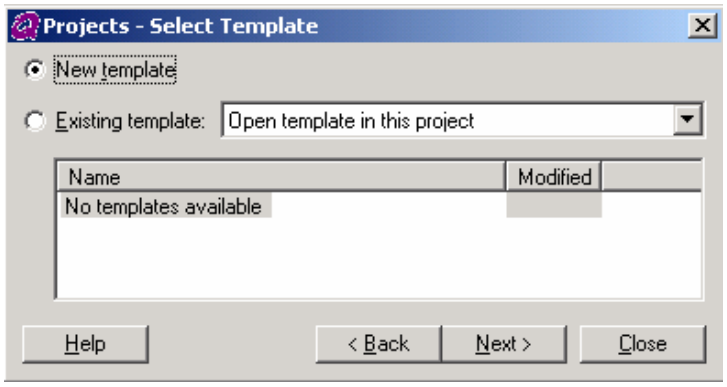
目的のフォルダを選択後、**Next>**をクリックする。（新規にフォルダを作成する場合はP21Project フォルダの作成を参照のこと。）

↓



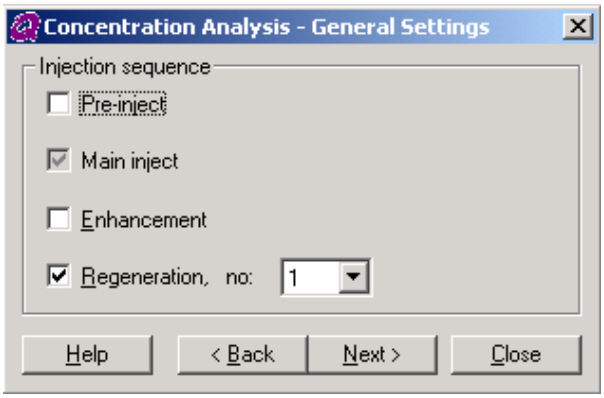
Concentration Analysis Wizard を選択し、**Next>**をクリックする。

↓



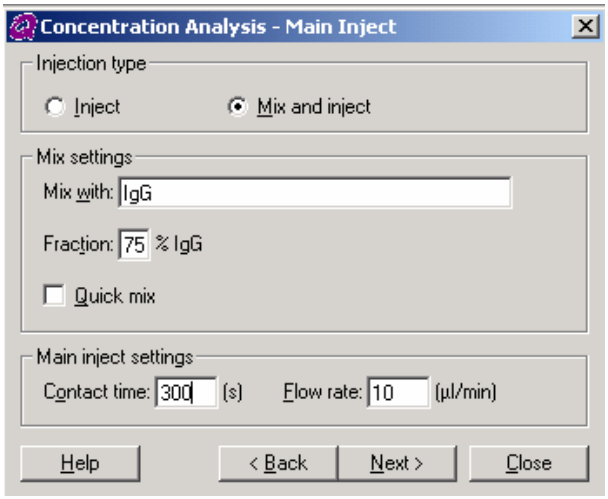
New template を選択し、**Next>**をクリックする。

↓



Regeneration にチェックを入れ、再生溶液の添加回数を入力し、**Next>**をクリックする。(詳細は 51 ページを参照のこと。)

↓

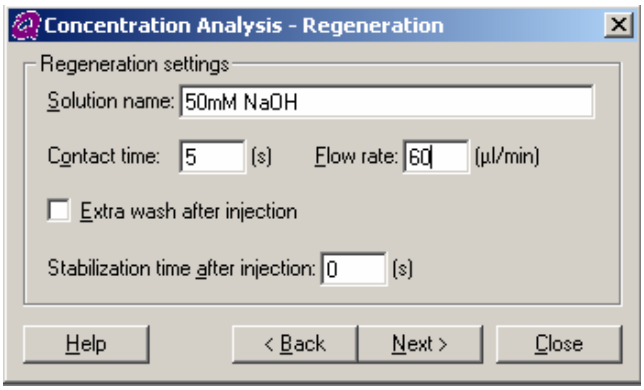


サンプルおよび検量線作成用定量分子の添加に関するパラメータの設定をおこなう。

Injection type は、**Mix and inject** を選択する。この選択により、定量分子は検出分子と混合

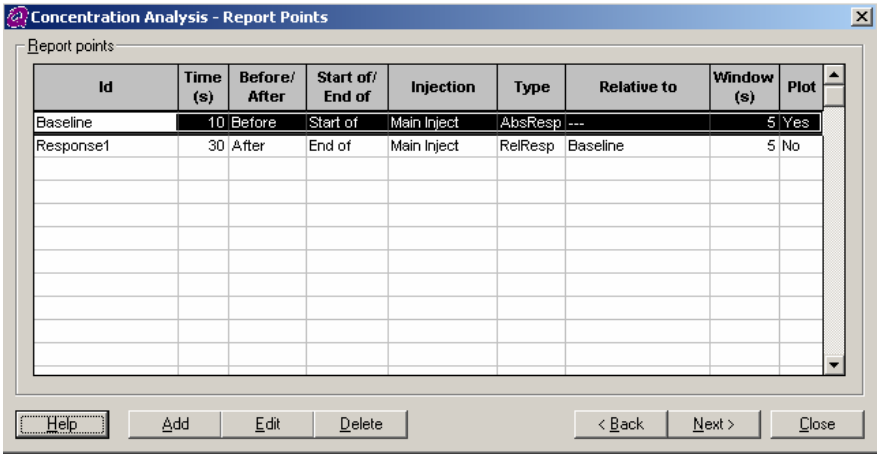
後添加される。Mix settings には、検出分子の名前と混合比率を入力する。ここでは、検出分子に IgG、混合比率を 75%で設定する。続いて、サンプル（混合溶液）の添加条件を設定し、**Next>**をクリックする。

↓



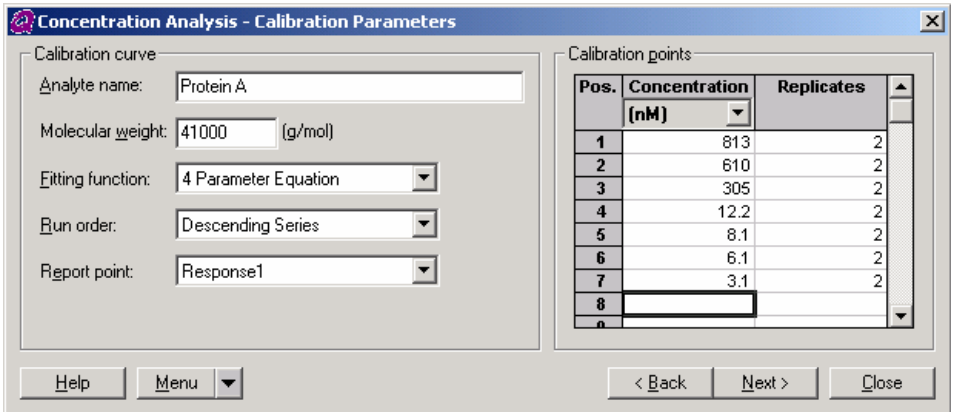
予備検討で決定した再生条件を入力し、**Next>**をクリックする。

↓



レポートポイントの設定をおこなう。（設定の方法については P53 レポートポイントの追加・変更を参照。）**Next>**をクリックする。

↓



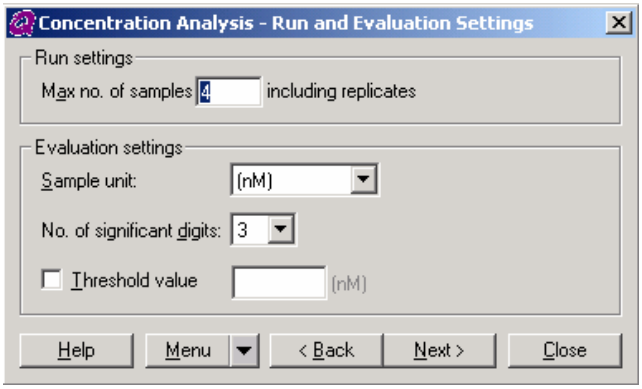
検量線の作成に関するパラメータを設定する。

Calibration curve 中のパラメータの説明を下記に示す。

Analyte name　　：定量分子名
Molecular weight　　：定量分子量
Fitting function　　：検量線のカーブフィッティングに使用するモデル
Run order　　：Calibration solution の測定順序
Reporting point　　：結合量を評価するレポートポイントの ID

次に、Calibration points 中に Calibration solution の濃度を入力する。Replicate は 1 濃度の繰り返し測定回数。この繰り返し測定回数は 1 濃度について連続測定をおこなう。全段階濃度を 1 シリーズとして、1 シリーズの測定を複数回繰り返す場合は、Replicate に 1 を入力し、Concentration に測定順序に応じた濃度を入力する。（例：10、8、6、4、2、1、0、10、8、6、4、2、.....）（検量線の作成頻度については 54 ページを参照。）設定後 **Next>**をクリックする。

↓



このテンプレートを使用した測定に関する設定をおこなう。Run settings 中の Max no. of samples では、このテンプレートを使用する上での最大測定サンプル数を入力する。

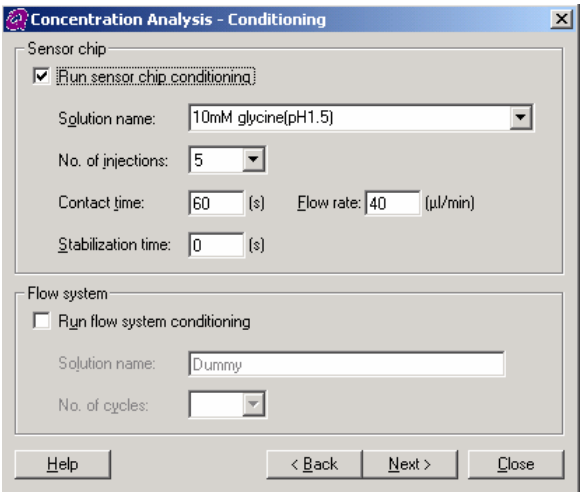
Evaluation settings 中のパラメータの説明を下記に示す。

Sample unit　　：結果の表示に使用する濃度単位
No. of significant digits　　：結果で表示される数値の有効桁数

Threshold value は基準値を設定する場合に使用する（測定結果を設定した基準値に対して評価し、negative／positive が追加表示される）。

設定後、**Next>**をクリックする。

↓



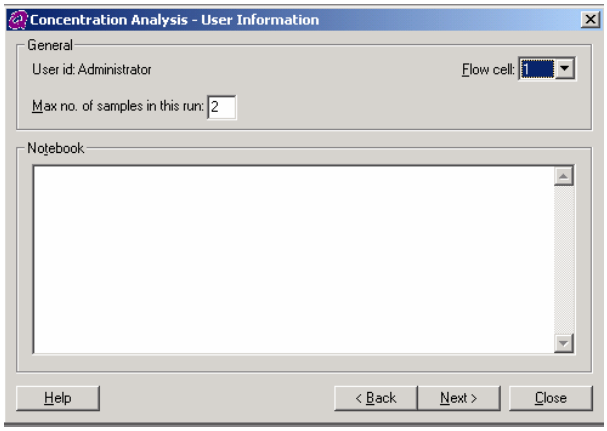
測定を始める前のコンディショニングに関する設定をおこなう。
Sensor chip 中の **Run sensor chip conditioning** をチェックし、センサーチップ表面のコンディショニング条件（再生条件）を入力する。

パラメータの説明を下記に示す。
Solution name　：再生溶液
No. of injections　：添加回数（通常 2～5 回）
Contact time　：接触時間
Flow rate　：流速
Stabilization time　：再生溶液添加後のベースラインの安定化時間

ダミーランを実施する場合は、Flow system 中の Run flow system conditioning をチェックし、流路系のコンディショニング条件を入力する。3 回程度実行することが望ましい。

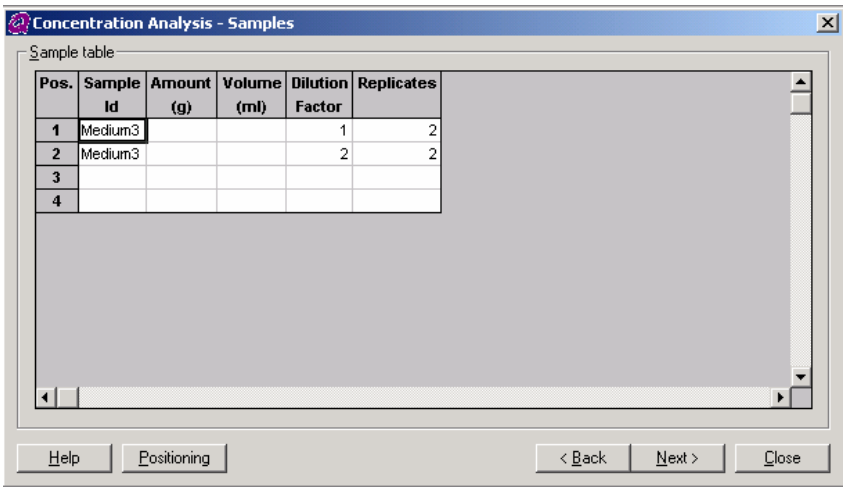
パラメータの説明を下記に示す。
Solution name　：0 濃度サンプル等
No. of cycles　：実行サイクル数（通常 2～10 回）
設定後 **Next>**をクリックする。

↓



Flow cell には測定に使用するフローセルを選択し、Max no. of samples in this run には測定最大サンプル数を入力する。（必要に応じて Notebook にメモを書き込む。）**Next>**をクリックする。

↓



サンプルに関する情報を Sample Table に入力する。

各カラムについての説明を下記に示す。

Sample Id　　：サンプル名

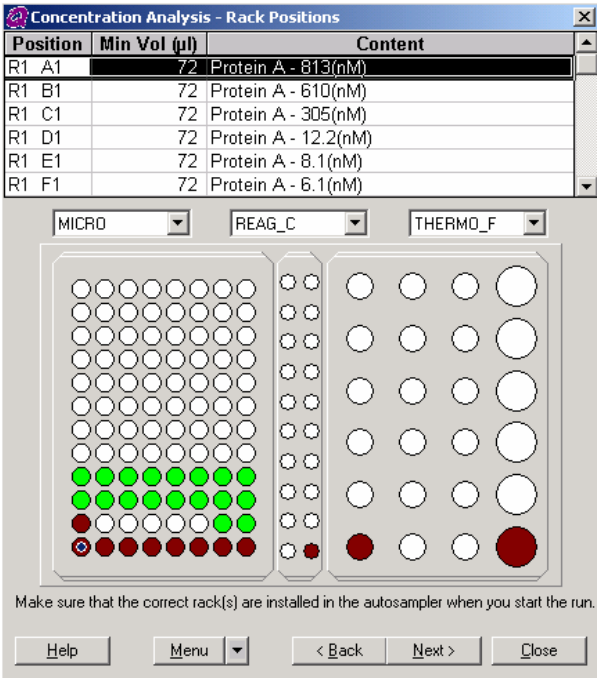
Amount（g）　　：サンプルの由来物質の質量

Volume（ ml）　　：サンプルの由来物質の容量

Dilution Factor　　：希釈倍率

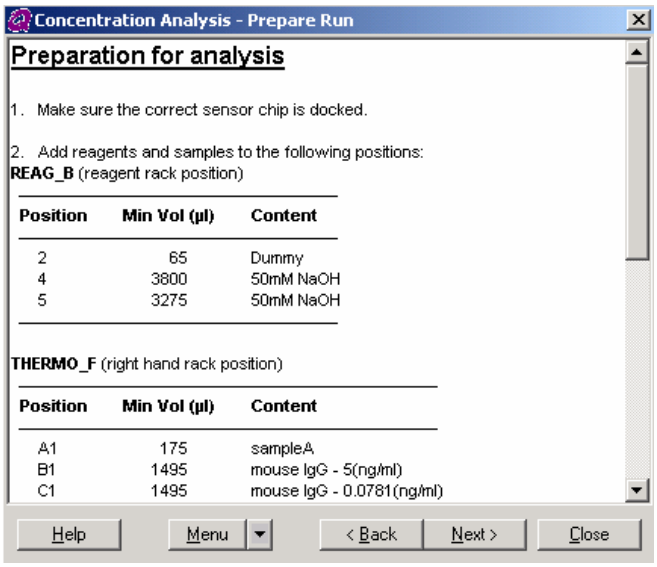
サンプルが由来した物質の質量または容量を入力することにより、抽出希釈倍率を自動的に計算した測定結果を得ることができる。希釈倍率を Dilution に入力することにより希釈倍率を掛けた測定結果を得ることができる。設定後 **Next>**をクリックする。

↓



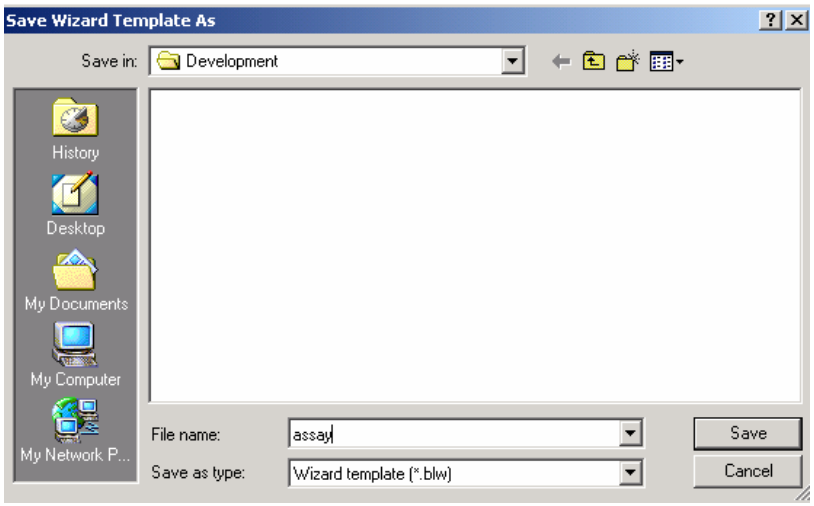
画面とシステム本体にセットしているラックが同一であることを確認する。試薬は Min Vol（ µl）カラムの必要量以上をセットする。
必要に応じて試薬の位置を変更することが可能である。その場合、使用するバイアルによって必要量が変るため、位置変更後、必ず Min Vol（ µl）カラムの必要量を確認する。
Next>をクリックする。

↓



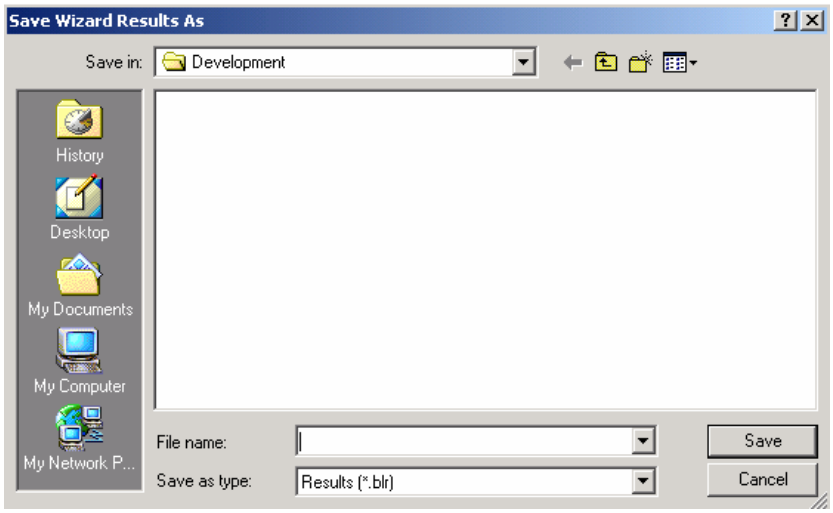
試薬の量、位置の確認をおこなう。**Next>**をクリックして、全画面確認する。最後の画面になると Next>ボタンが Start に変わる。**Start** をクリックする。

↓



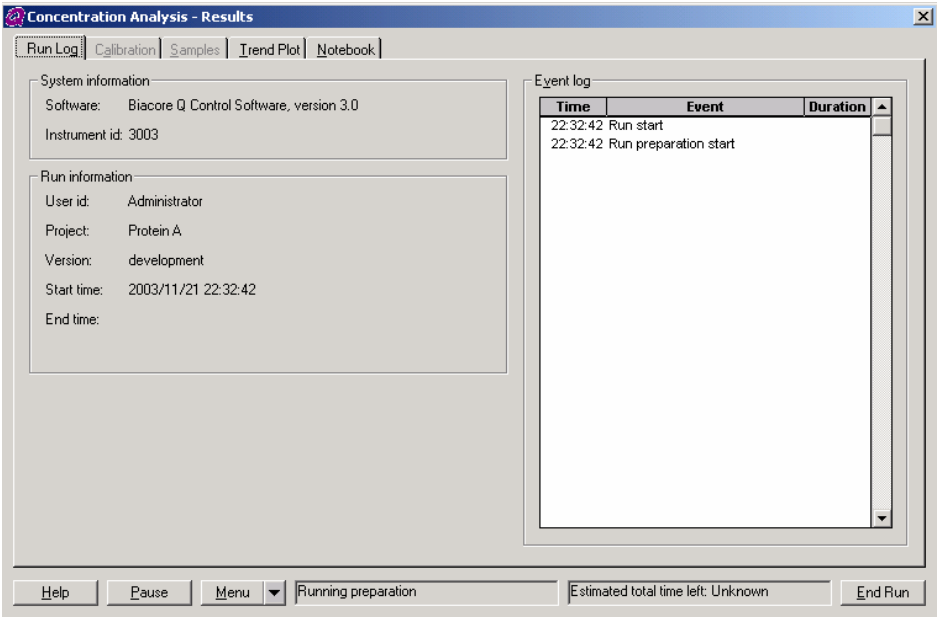
必要に応じて、測定条件をテンプレートとして保存する。保存先は、Development（C : / BIA Projects / 目的の Project フォルダ/ Concentration Analysis / Development ）を選択する。

↓



結果の保存先を設定し、ファイル名を付け、**Save** をクリックする。

↓

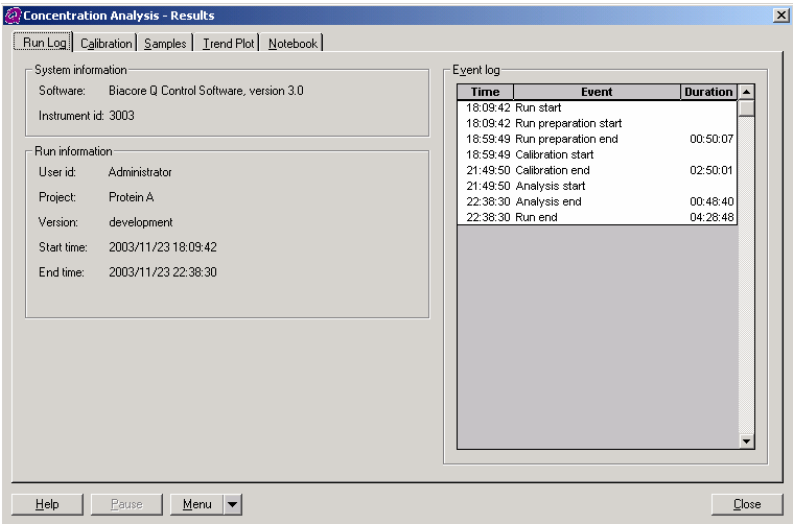


濃度測定が開始される。

測定中に使用できる機能に関しては P60 測定サンプルの変更、追加、削除を参照。

↓

測定が終了すると、下記ボックスに各種結果が表示される。ボックス上方のタブをクリックし、画面を切り替える。

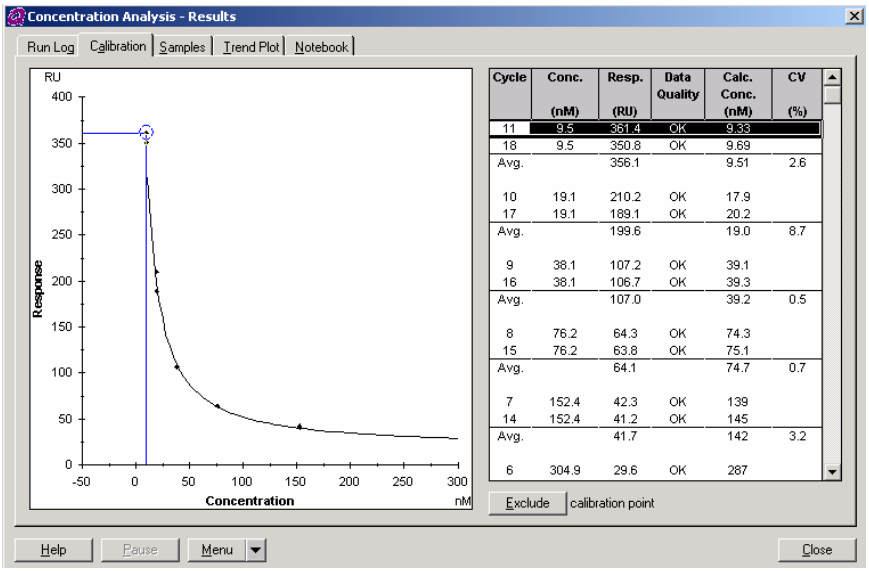


Run Log タブには下記の情報が表示される。

system information　：システム情報

Run information　：測定の実行に関する情報

Event log　：測定の経時記録

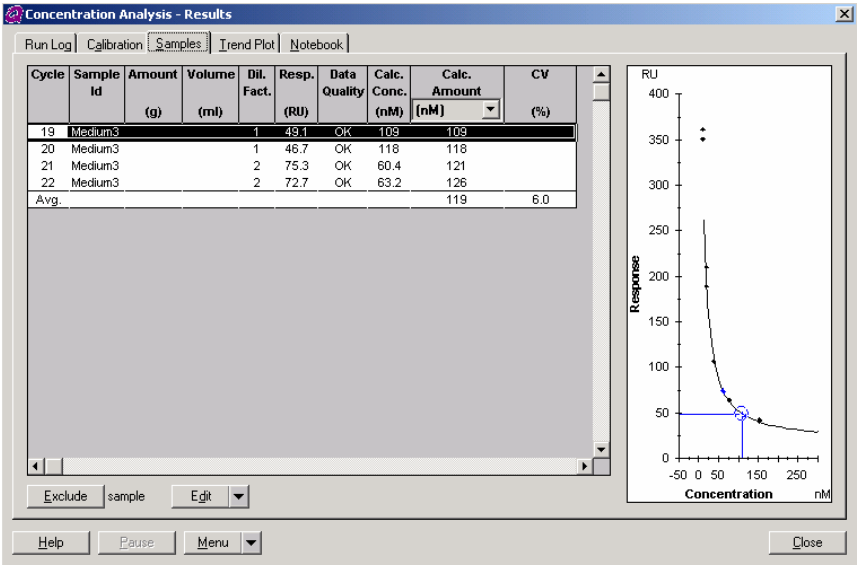


Calibration タブには検量線の結果が表示される。

各カラムの説明を下記に示す。

Cycle　　：測定サイクル番号
Conc.（μg/ ml）　：Calibration Solution 濃度
Resp(RU)　　：結合レスポンス
Data Quality　　：データクオリティ（シグナルが正常に測定できているか）
Calc.Conc.　　：検量線から算出した濃度
CV(%)　　：CV 値

エアーの混入などのトラブルにより、全体から著しく逸脱してしまったポイントは、データポイントを選択して右下の **Exclude** をクリックすることで検量線から外すことができる。そのデータポイントは表示が×に変更される。この×を選択すると、Exclude ボタンは Include に変わる。**Include** をクリックすると、再び検量線に戻すことができる。



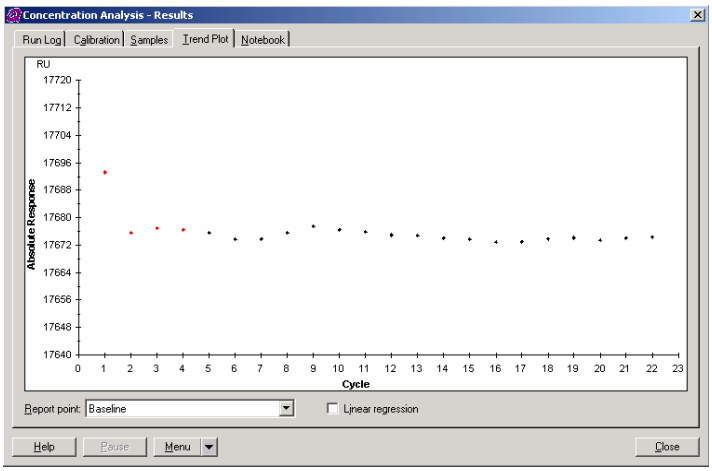
Sample タブにはサンプル測定結果が表示される。

各カラムの説明を下記に示す。

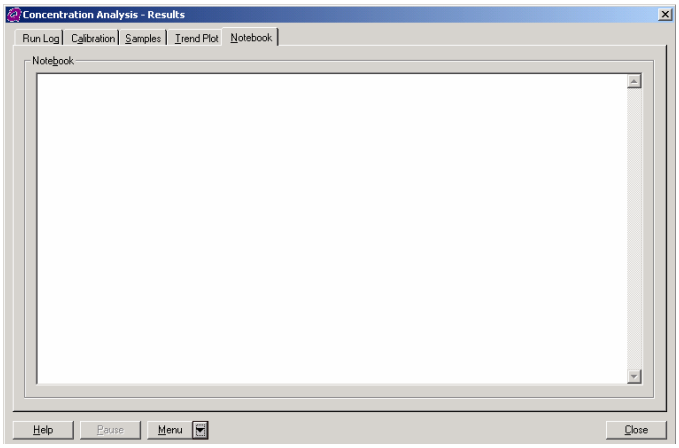
Cycle　　：測定サイクル番号
Sample Id　　：サンプル名
Amount(g)　　：サンプルの由来物質の質量
Volume(ml)　　：サンプルの由来物質の容量
Dil.Fact.　　：希釈倍率
Resp(RU)　　：結合レスポンス
Data Quality　　：データクオリティ（シグナルが正常に測定できているか）
Calc.Conc.　　：検量線から算出した濃度
Calc.Amount　　：由来物質中の濃度
CV(%)　　：CV 値

Wizard 中で、あらかじめ Threshold value を設定した場合、Thershold カラムが存在し、設定した値に対して、Positive、Negative が追加表示される。
サンプル情報、検量線の変更は P64 サンプル情報、検量線の変更を参照。

↓

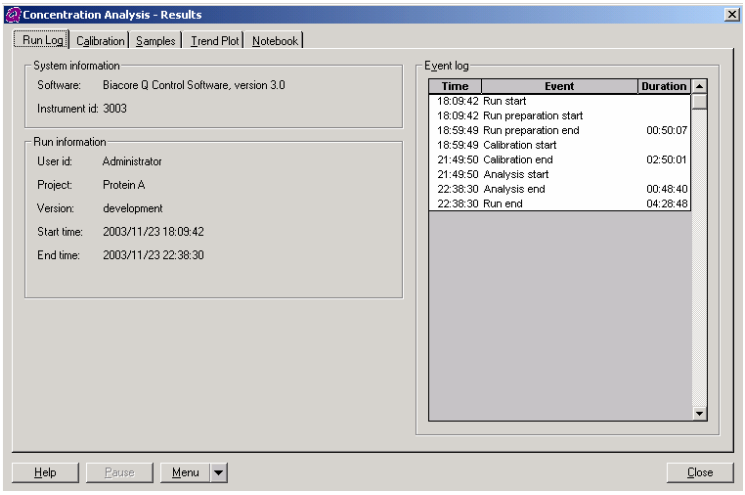


Trend Plot タブにはサイクルごとに記録したレポートポイントのプロットが表示される。左下の Report point のプルダウンメニューで表示するレポートポイントを変更できる。ポイント中、コンディショニングサイクルは赤、測定サイクルは黒で表示される。



Notebook タブにはメモを任意に入力することができる。このタブに入力したメモ内容は随時変更可能である。

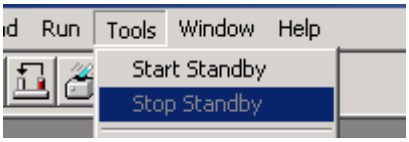
↓



Close をクリックし、測定を終了する。

↓

Standby が実行されている。



Tools → **Stop Standby** をクリックし、Standby を停止する。画面上のセンサーグラムは Close する。

測定結果の印刷については、68 ページ測定結果の印刷を参照。

4. シャットダウン

4.1 実験の終了

2 つの方法のうち、どちらかで 1 日の実験を終了する。

- **Standby** 状態での放置・・　4 日以内にシステムを使用する場合
- 電源を落として終了・・・　4 日以上使用しない場合

Standby 状態での放置

Tools → **Start Standby** を選択し実行する。

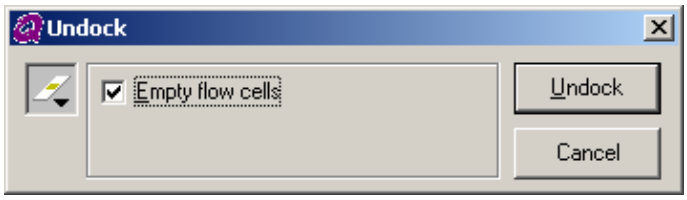
5 µl/min の流速で最大 4 日間（96 時間）、ランニング緩衝液を送り続ける。
96 時間 Standby を続ける場合、ランニング緩衝液の必要量は 80　ml 程度である。
途中で終了する場合には、**Tools** → **Stop Standby** で終了する。

電源を落として終了

ボトルベースに超純水をセットし、**Tools** → **Working Tools** の中から **Prime** を選択して実行する。
引き続きセンサーチップの取り出し、電源のオフをおこなう。

4.2 センサーチップの取り出し

Command → **Undock** をクリックし、センサーチップを取り出す。



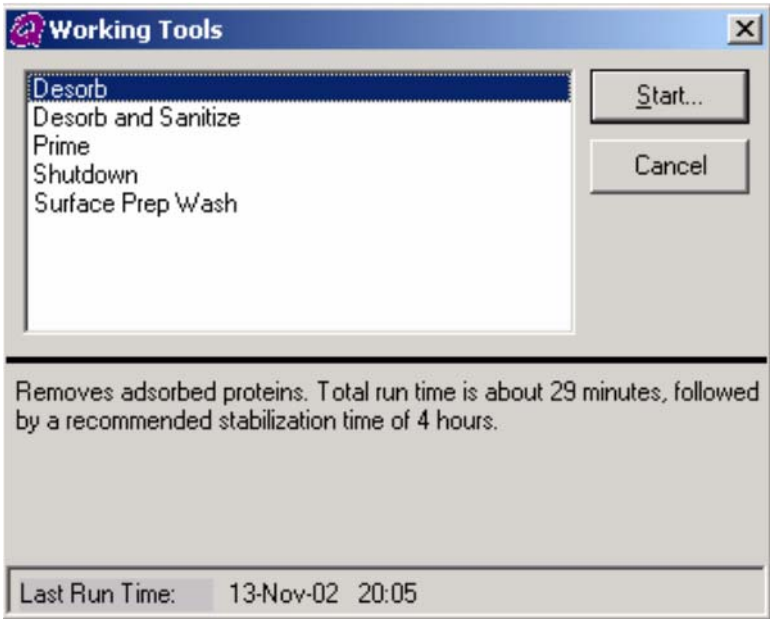
フロントパネルの Sensor chip の緑のライトが点灯から点滅に変わったら、黒いカバーを開け、コンベアを完全に引いて、センサーチップを取り出す。

4.3 電源のオフ

Biacore Q Control Software を閉じ、システム本体、モニター、プリンター等の電源を切る。

5. メンテナンス

Biacore のメンテナンスは、**Working Tools**（**Tools → Working Tools**）中のコマンドを用いておこなう。メンテナンスに必要な試薬は **Biacore Maintenance Kit** に含まれている（**Surface Prep Wash** に利用する試薬は含まれていない）。



5.1 日々のメンテナンス

Prime　（所要時間約 7 分間）

ポンプ、マイクロ流路系、オートサンプラー等の接液部分を、ボトルベースにセットしている緩衝液または超純水で置換洗浄する。

5.2 毎週のメンテナンス

Desorb　（所要時間約 29 分間）

マイクロ流路系やフローセル等に付着したサンプル中のタンパク質や疎水性物質を洗浄除去する。

（準備するもの）

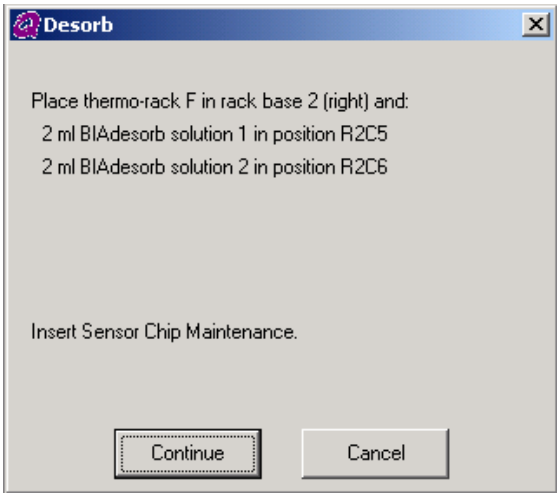
試薬	• BIAdesorb solution 1	2　ml
	• BIAdesorb solution 2	2　ml
	＊11 mm プラスチックバイアルを使用する。	
センサーチップ	• Sensor Chip Maintenance	
ボトルベース	• 超純水	200　ml

Desorb を選択して **Start** をクリックする。

↓

Undock が始まる。

↓

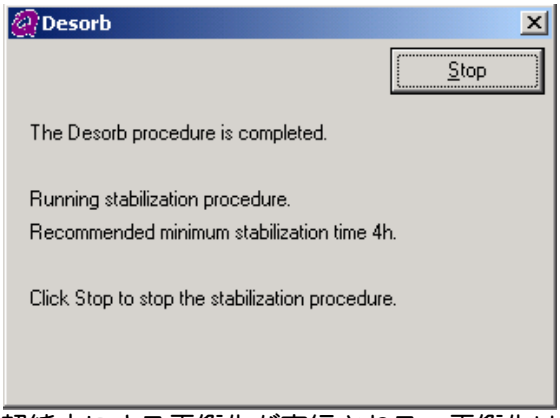

Desorb
Place thermo-rack F in rack base 2 (right) and:
2 ml BIAdesorb solution 1 in position R2C5
2 ml BIAdesorb solution 2 in position R2C6
Insert Sensor Chip Maintenance.
Continue
Cancel

Undock 終了後、Sensor Chip Maintenance に入れ替え、ボックス中で指示された位置に試薬をおき、**Continue** をクリックする。

↓

約 27 分間 Desorb が実行される。

↓



Desorb 終了後、続けて超純水による平衡化が実行される。平衡化は、4 時間以上実施することをお勧めする。終了する時は、**Stop** をクリックする。

5.3 毎月のメンテナンス

Desorb and Sanitize　（所要時間約 77 分間）
マイクロ流路系、フローセル、インレットチューブ、シリンジ等を洗浄殺菌する。

（準備するもの）

試薬	• BIAdesorb solution 1	2 ml
	• BIAdesorb solution 2	2 ml
	＊11 mm プラスチックバイアルを使用する。	
	• BIAdisinfectant solution（conc.）1.5　ml＋超純水 20　ml	
	＊ Maintenance Kit 付属の容器（30　ml 容）を使用する。	
センサーチップ	• Sensor Chip Maintenance	
ボトルベース	• 超純水	200　ml

Desorb and Sanitize を選択し、**Start** をクリックする。

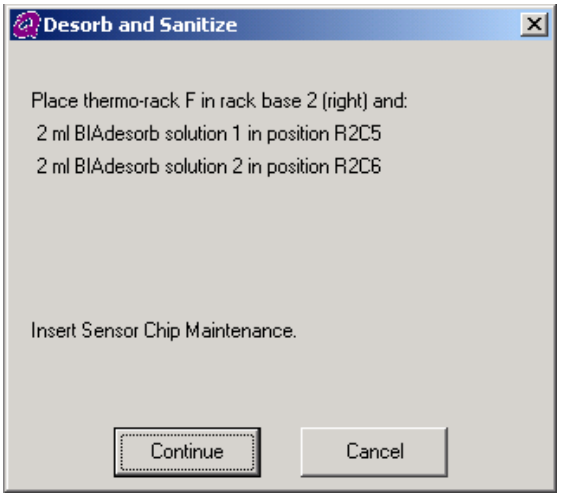
↓

必要な試薬類を確認し、**Continue** をクリックする。

↓

Undock が始まる。

↓

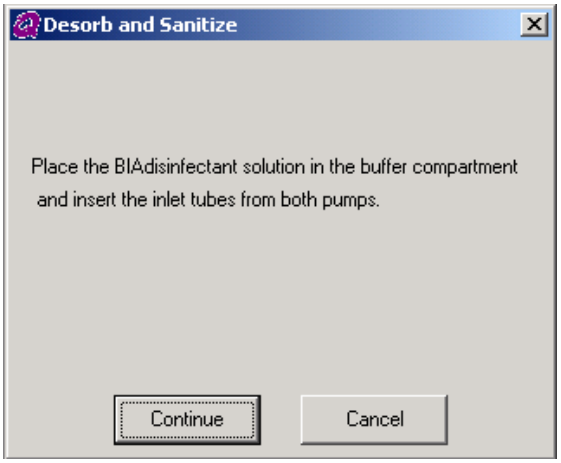

Desorb and Sanitize
Place thermo-rack F in rack base 2 (right) and:
2 ml BIAdesorb solution 1 in position R2C5
2 ml BIAdesorb solution 2 in position R2C6
Insert Sensor Chip Maintenance.
Continue
Cancel

Undock 終了後、Sensor Chip Maintenance に入れ替え、ボックス中で指示された位置に試薬をおき、**Continue** をクリックする。

↓

約 27 分間 Desorb が実行される。

↓

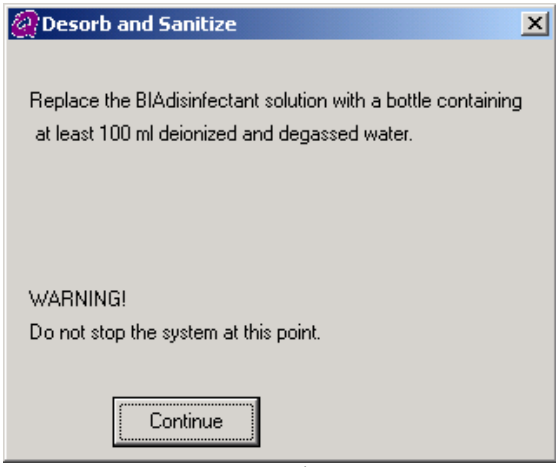

Desorb and Sanitize
Place the BIAdisinfectant solution in the buffer compartment and insert the inlet tubes from both pumps.
Continue
Cancel

Desorb 終了後、ボトルベースの超純水を、希釈した BIAdisinfectant solution に換えて **Continue** をクリックする。

↓

約 34 分間 Sanitize が実行される。

↓

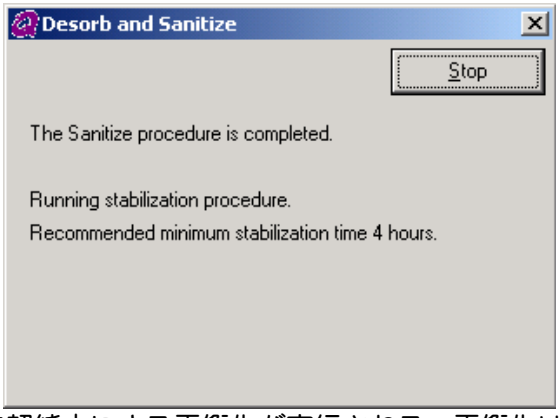

Desorb and Sanitize
Replace the BIAdisinfectant solution with a bottle containing at least 100 ml deionized and degassed water.
WARNING!
Do not stop the system at this point.
Continue

ボトルベースの BIAdisinfectant solution を超純水に替えて **Continue** をクリックする。

↓

約 7 分間 超純水による洗浄が実行される。

↓



Sanitize 終了後、続けて超純水による平衡化が実行される。平衡化は 4 時間以上実施することをお勧めする。終了する時は、**Stop** をクリックする。

5.4 Surface Prep ユニットのメンテナンス

Surface Prep Wash　（所要時間約 21 分間）
Surface Prep ユニットを洗浄する。

（準備するもの）

試薬	• 50% isopropanol,10% formic acid in water（solution1）	4 ml
	• 50% DMSO in water（solution2）	4 ml
	＊16 mm ガラスバイアルを使用する。	
センサーチップ	• Sensor Chip Maintenance	1 枚
ボトルベース	• 超純水	200 ml

システム本体に洗浄用センサーチップを Dock し、超純水による Prime をおこなう。

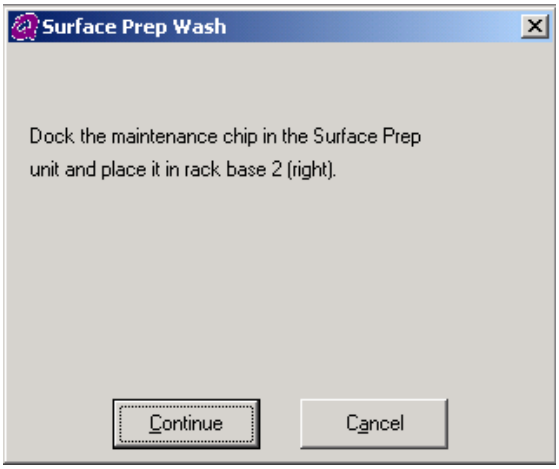
↓

ラックの設定をおこなう。Rackbase1：Thermo_F、Rackbase2：〔None〕

↓

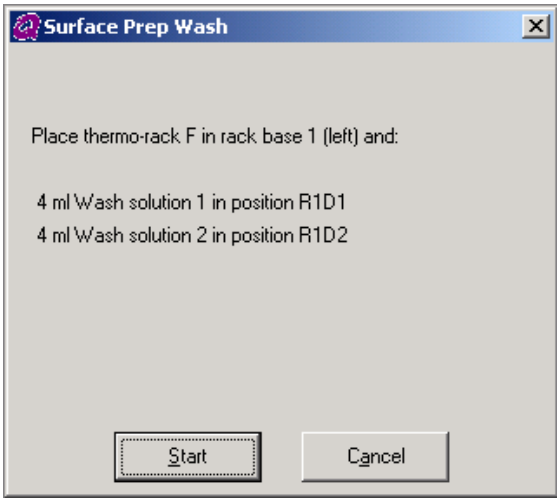
Surface Prep Wash を選択し、**Start** をクリックする。

↓



Surface Prep ユニットに Maintenance chip を Dock 後、Rackbase2 にセットし、**Continue** をクリックする。

↓

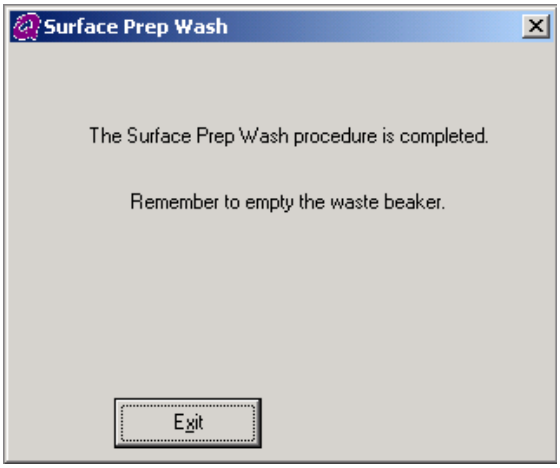

Surface Prep Wash
Place thermo-rack F in rack base 1 (left) and:
4 ml Wash solution 1 in position R1D1
4 ml Wash solution 2 in position R1D2
Start
Cancel

指示された位置に試薬をおき、**Start** をクリックする。

↓

約 21 分間 Surface Prep Wash が実行される。

↓



洗浄後、確認ボックスが表示される。**Exit** をクリックし終了する。

↓

Surface Prep ユニットを取り出し、廃液ビーカーにたまった廃液を捨てる。

6. システムの診断

System check　（所要時間約 1 時間）
システムが自己診断をおこなう。**Desorb and Sanitize** を実行後におこなうことをお勧めする。

（準備するもの）

試薬	• BIAtest solution	1 ml
センサーチップ	• Sensor Chip **System Check**	
ボトルベース	• HBS-EP（Biacore 社製品）	200 ml

システム本体に Sensor Chip **System Check** を Dock し、HBS-EP を用いて Prime をおこなう。

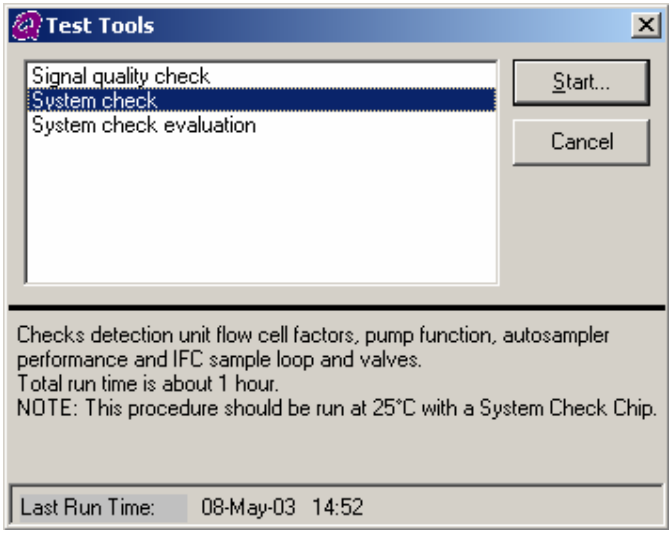
↓

Rack base2 に Thermo_F をセットし、ラックベースの設定をおこなう。

↓

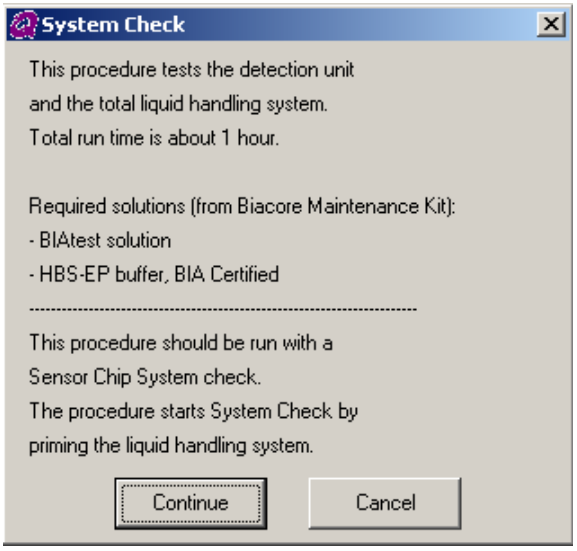
Tools → **Test tools** をクリックする。

↓


Test Tools
Signal quality check
System check
System check evaluation
Start...
Cancel
Checks detection unit flow cell factors, pump function, autosampler performance and IFC sample loop and valves.
Total run time is about 1 hour.
NOTE: This procedure should be run at 25°C with a System Check Chip.
Last Run Time:
08-May-03 14:52

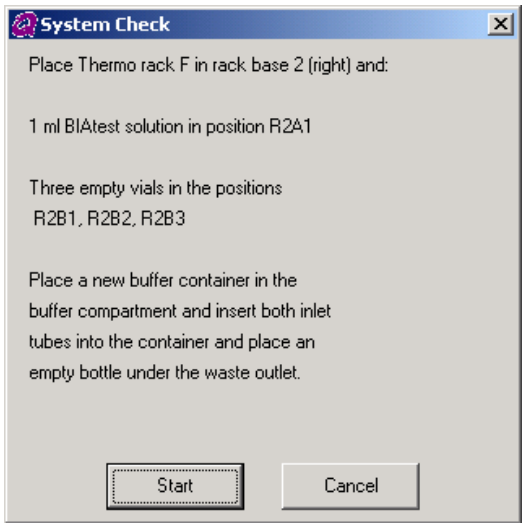
System Check を選択し、**Start...**をクリックする。

↓


System Check
This procedure tests the detection unit
and the total liquid handling system.
Total run time is about 1 hour.
Required solutions (from Biacore Maintenance Kit):
- BIAtest solution
- HBS-EP buffer, BIA Certified
This procedure should be run with a
Sensor Chip System check.
The procedure starts System Check by
priming the liquid handling system.
Continue
Cancel

必要な試薬を確認して、**Continue** をクリックする。

↓

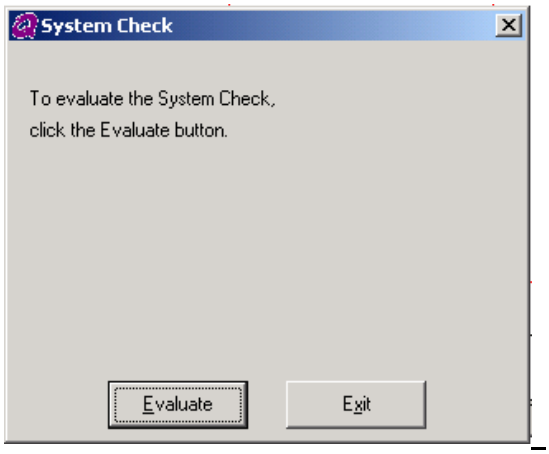

System Check
Place Thermo rack F in rack base 2 (right) and:
1 ml BIAtest solution in position R2A1
Three empty vials in the positions
R2B1, R2B2, R2B3
Place a new buffer container in the
buffer compartment and insert both inlet
tubes into the container and place an
empty bottle under the waste outlet.
Start
Cancel

試薬・バイアルの位置を確認して、**Start** をクリックする。

↓

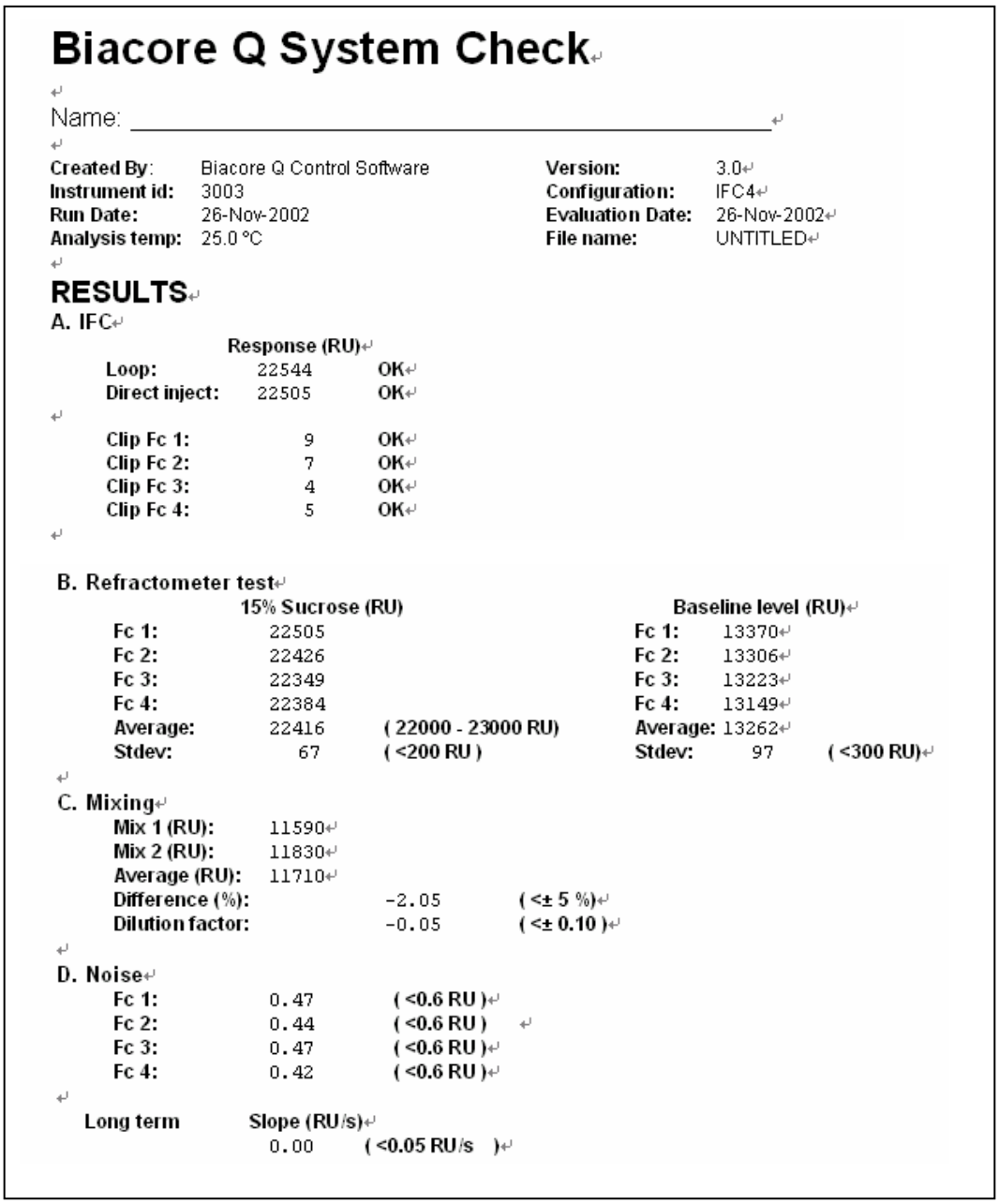
約 1 時間 System Check が実行される。

↓



Evaluate をクリックする。

↓



Biacore Q System Check

Name: _____

Created By:	Biacore Q Control Software	**Version:**	3.0
Instrument id:	3003	**Configuration:**	IFC4
Run Date:	26-Nov-2002	**Evaluation Date:**	26-Nov-2002
Analysis temp:	25.0 °C	**File name:**	UNTITLED

RESULTS

A. IFC

	Response (RU)	
Loop:	22544	OK
Direct inject:	22505	OK
Clip Fc 1:	9	OK
Clip Fc 2:	7	OK
Clip Fc 3:	4	OK
Clip Fc 4:	5	OK

B. Refractometer test

	15% Sucrose (RU)		Baseline level (RU)		
Fc 1:	22505		**Fc 1:**	13370	
Fc 2:	22426		**Fc 2:**	13306	
Fc 3:	22349		**Fc 3:**	13223	
Fc 4:	22384		**Fc 4:**	13149	
Average:	22416	**(22000 - 23000 RU)**	**Average:**	13262	
Stdev:	67	**(<200 RU)**	**Stdev:**	97	**(<300 RU)**

C. Mixing

Mix 1 (RU):	11590		
Mix 2 (RU):	11830		
Average (RU):	11710		
Difference (%):	-2.05	**(<± 5 %)**	
Dilution factor:	-0.05	**(<± 0.10)**	

D. Noise

Fc 1:	0.47	**(<0.6 RU)**
Fc 2:	0.44	**(<0.6 RU)**
Fc 3:	0.47	**(<0.6 RU)**
Fc 4:	0.42	**(<0.6 RU)**

Long term	**Slope (RU/s)**	
	0.00	**(<0.05 RU/s)**

異常がある場合には**Check！**の表示、または基準値の範囲外の数値となる。

異常がある場合には、技術サービス部に連絡する。

Biacore Q Maintenance Kitについて

メンテナンスおよびシステムの診断に必要な試薬類が含まれている。
キットに含まれる試薬は次のとおりである。

BIAtest solution	65 ml	[15% (w/w) sucrose in HBS-EP buffer]
BIAnormalization solution	30 ml	[40% glycerol]
BIAnormalization solution	30 ml	[70% glycerol]
BIAdesorb solution 1＊	90 ml	[0.5% (w/v) sodium dodecyl sulphate(SDS)]
BIAdesorb solution 2	90 ml	[50mM glycine pH9.5]
BIAdisinfectant solution (conc.)	10 ml	[Sodium hypochlorite(conc.)]
HBS-EP buffer	200 ml	[0.01M HEPES,0.15M NaCl,3mM EDTA,0.005% (v/v) SurfactantP20,pH7.4]
Sensor Chip maintenance	1枚	
Sensor Chip System Check	1枚	

Sanitize用プラスチックチューブ＆スタンド
Rubber caps Type 2
プラスチックバイアル2.0 ml
ガラスバイアル16mm
試薬ラベル
センサーチップ保存容器

保存方法：4℃で保存
＊BIAdesorb solution 1 は常温保存。

7. ユーザー権限の管理

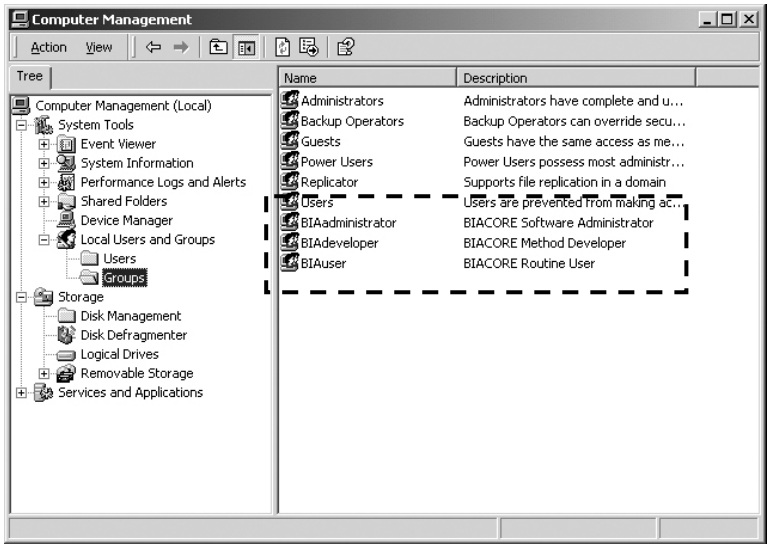
7.1 ユーザー権限

BiacoreQ Control Software は、2 つのレベルでセキュリティーを設定することが可能である。

7.1.1 ユーザーレベルのセキュリティー

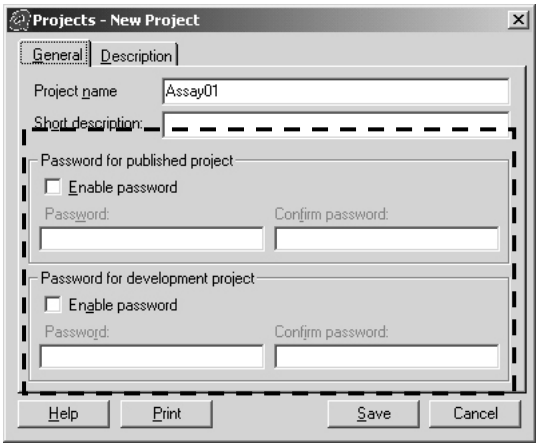
Windows 2000 の機能を利用して、Biacore Q システム使用者のユーザー権限を 3 グループ（BIAadministrator, BIAdeveloper, BIAuser）に分けている。

Biacore Q システム使用者は、コントロール用 PC にログオンした時点で何れかのグループに所属する。



7.1.2 Project レベルのセキュリティー

BIAadministrator および BIAdeveloper のユーザー権限で Project にパスワードを設定することができる。さらに、同一の Project に対して、BIAadministrator および BIAdeveloper が編集可能な『development project』と BIAuser 向けに公開する『published project』で個別にパスワードを設定できる。



ユーザー権限の比較

	BIAadministrator	BIAdeveloper	BIAuser
Development Project の編集・実行	+	+	-
公開された Project の編集・実行	+	+	-
公開された Project の実行	+	+	+*1
Project の公開	+	+	-
Project へのパスワードの設定*2	+	+	-
Project のパスワードによる制限	-*3	+	+
Assay Development Wizard の実行*4	+	+	-
マニュアル操作の制限*5	-	-	+

*1. 公開された Project では、サンプル数および名称変更程度のみ。

*2. パスワードは大文字小文字を区別する。

*3. BIAadministrator は、パスワードによる制限を全く受けない。

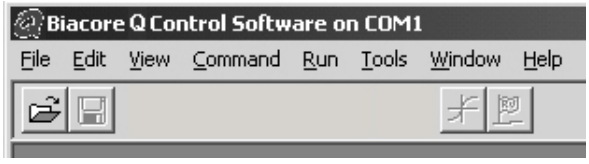
*4. Assay Development Wizard を公開することはできない。

*5. BIAuser は、**Dock**, **Undock**, **Working Tools** 以外のマニュアル操作をおこなうことができない（**Toolbar** の比較参照）。

Toolbar の比較

BIAadministrator または BIAdeveloper

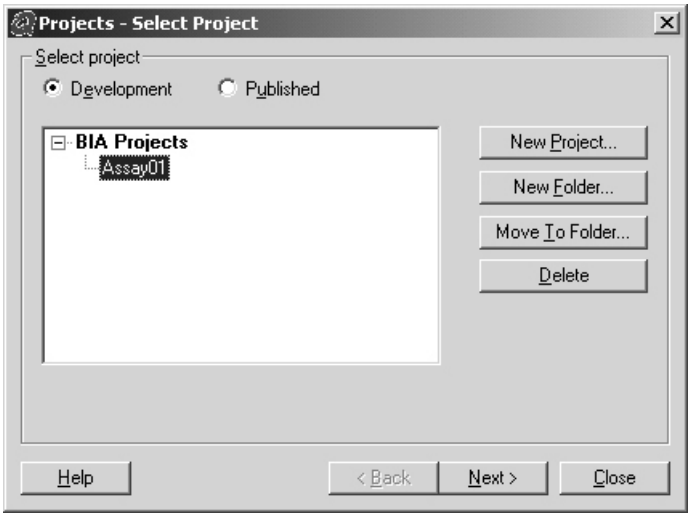
BIAuser



7.2　Project の公開（BIAadministrator、BIAdeveloper）

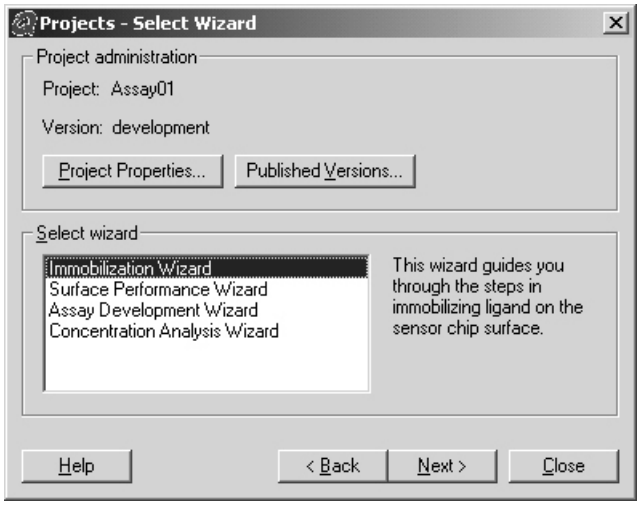
Run → **Run Project...**を選択する。

↓



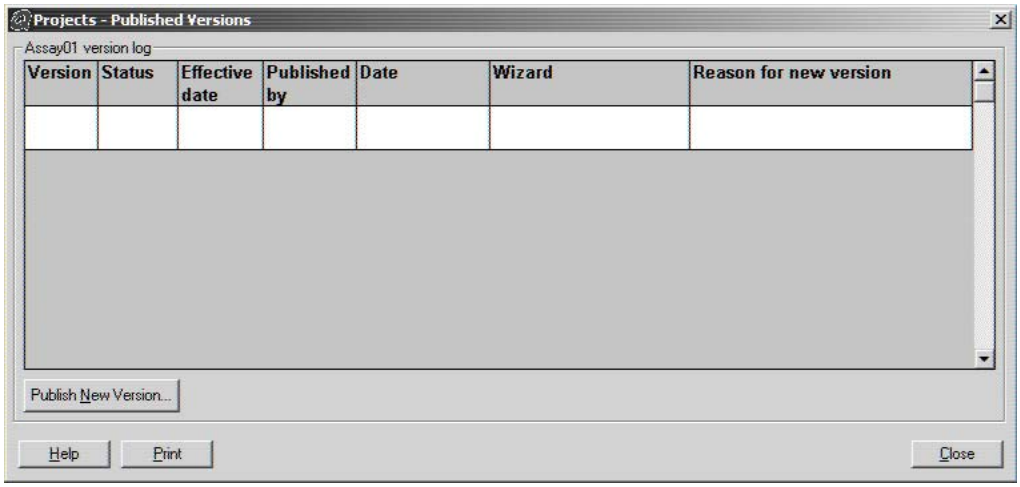
Development を選択し、目的の Project を選択して **Next>**をクリックする。

↓



Published Versions...をクリックする。

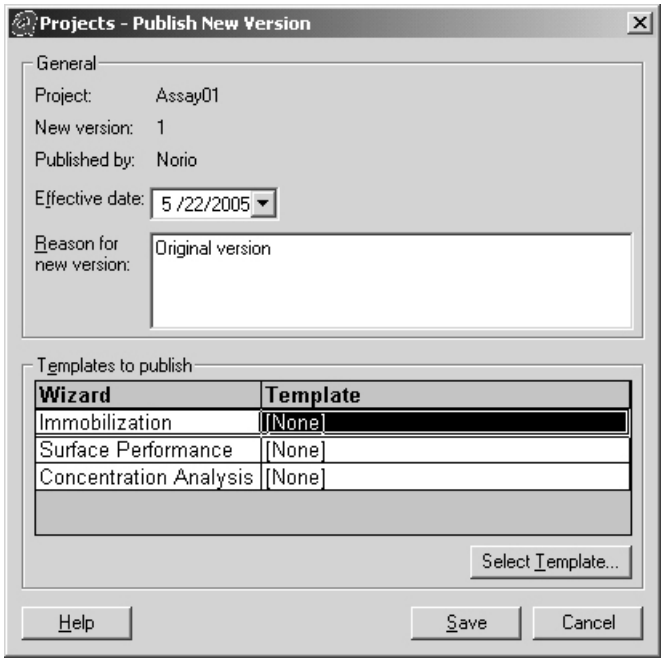
↓



Project から公開したバージョンのリストが表示される。

Publish New Version...をクリックする。

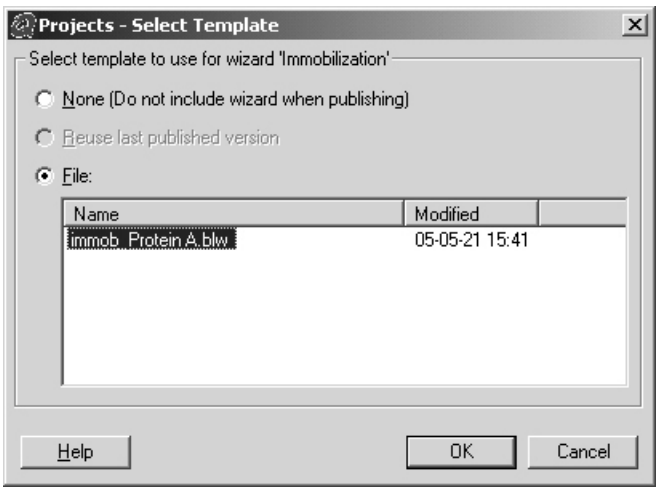
↓



公開する Project 内の Wizard のカテゴリー（Immobilization, Surface Preparation, Concentration Analysis）を選択する。の一つ以上の Wizard テンプレートが必要となる。

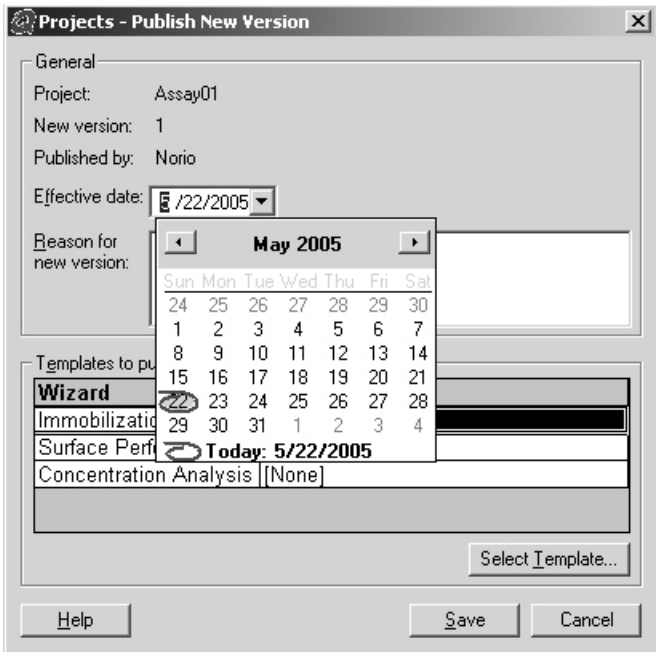
Select Template...をクリックする。

↓



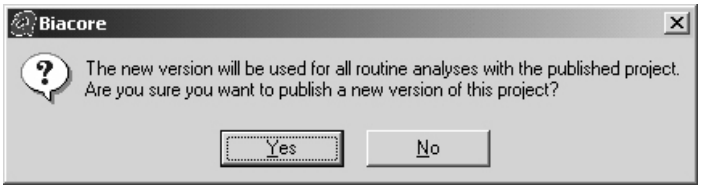
Project 内の Wizard カテゴリー内のテンプレートのリストが表示される。
公開するテンプレートを選択して **OK** をクリックする。

↓



Effective date で使用開始日を選択する。
Save をクリックする。

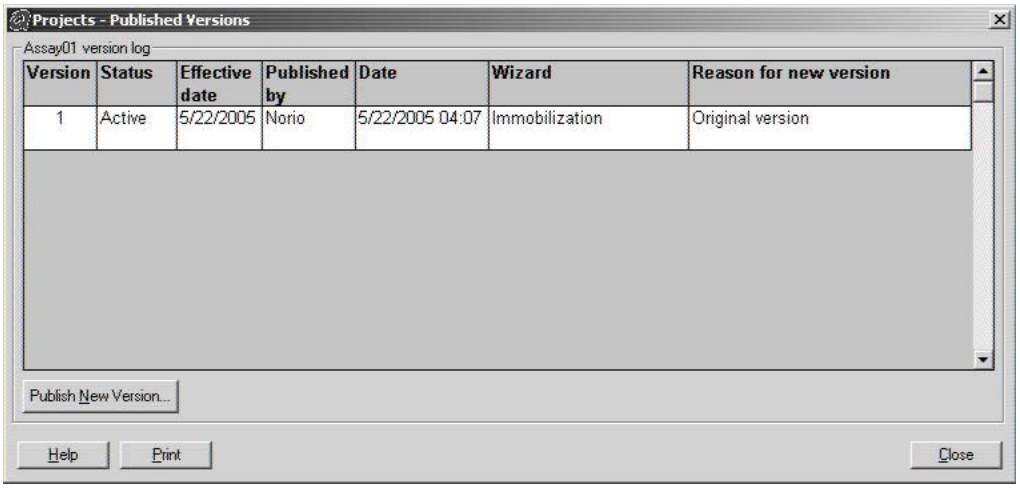
↓


Biacore
The new version will be used for all routine analyses with the published project.
Are you sure you want to publish a new version of this project?
Yes
No

確認の画面が表示される。**Yes** をクリックする。

↓

OK をクリックすると公開した Project が Published Version ボックスに表示される。

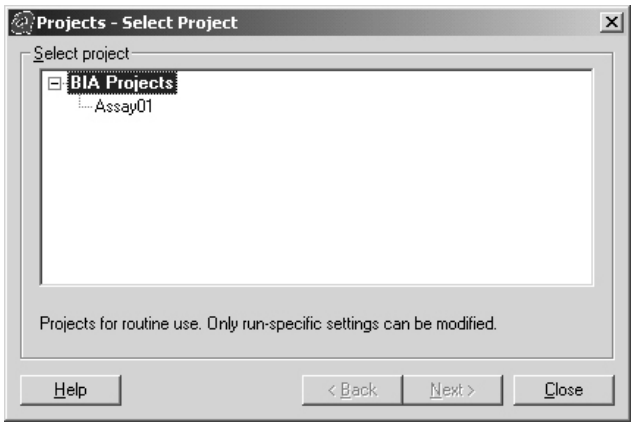


Close をクリックすると、**Select Wizard** ボックスが表示される。
さらに **Close** をクリックして終了する。

7.3 公開された Project の使用（BIAuser）

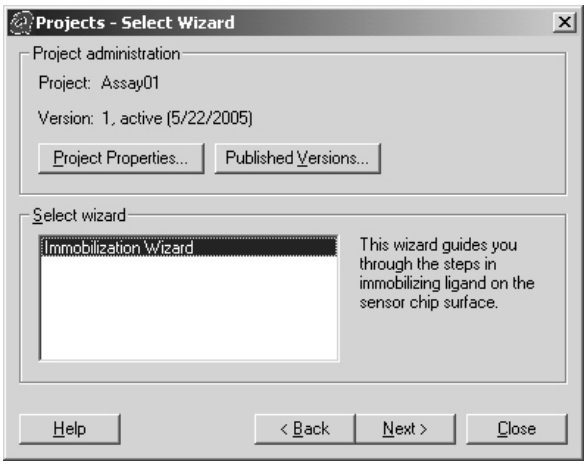
Run → Run Project...を選択する。

↓



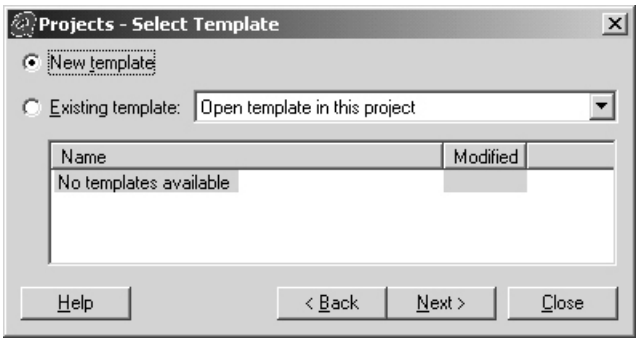
目的の Project を選択して **Next>**をクリックする。

↓



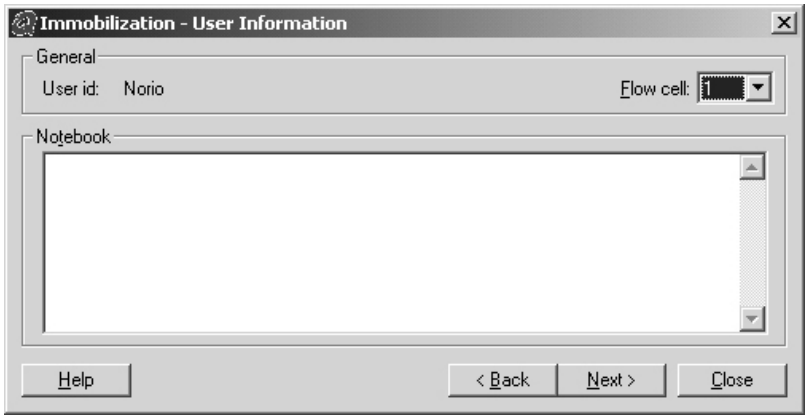
目的の Wizard を選択して **Next>**をクリックする。

↓



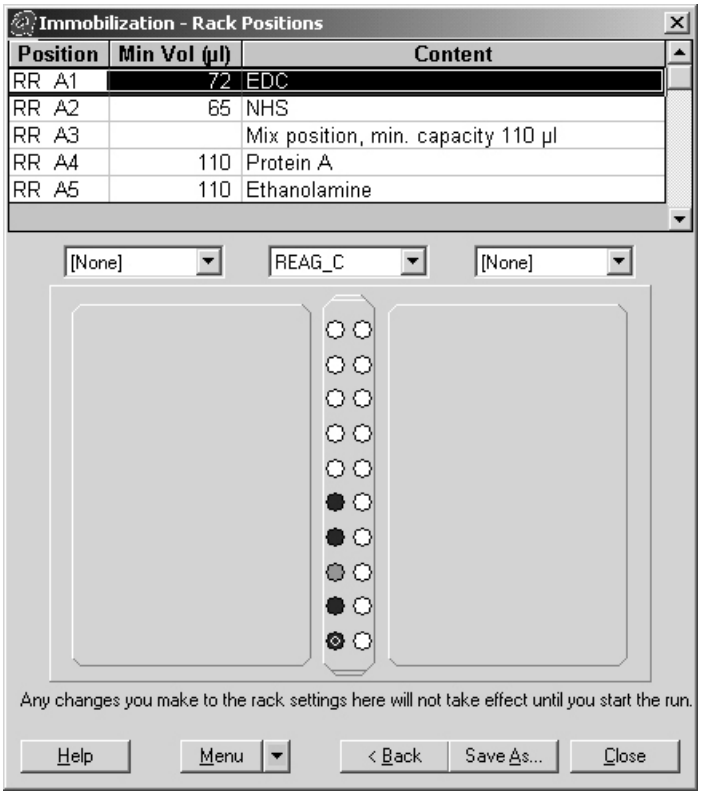
New template をマークして **Next>**をクリックする。

↓



固定化をおこなう **Flow cell** を選択して **Next>**をクリックする。
(必要に応じて **Notebook** にメモを書き込む。)

↓



システム本体にセットしているラックを確認して、指示通りに各試薬をセットする。必要に応じてサンプルポジションを変更する。

（以降の操作は、BIAadministrator, BIAdeveloper, BIAuser 共通）

安全上のご注意

必ずお守りください

このしおりには、弊社機器に関する一般的な注意事項を記載しています。取扱いの詳細は必ず製品添付の使用説明書をご覧ください。

誤った取扱いをした場合に生じる危険や損害の程度を、次の区分で説明しています。

警告 誤った取扱いをした場合に、死亡や重傷を負う可能性があるもの。

注意 誤った取扱いをした場合に、傷害または物的損害が発生する可能性があるもの。

図記号の意味は次の通りです。

禁 止 ⃠は、してはいけない「禁止」を示します。

❗は、必ず実行していただく「強制」を示します。

警告

禁 止

電源プラグの抜き差しにより、運転を停止しない

火災・感電の原因になります。

禁 止

電源コードを途中で接続しない、タコ足配線をしない

火災・感電・故障の原因になります。

禁 止

電源コード・電源プラグを傷つけない

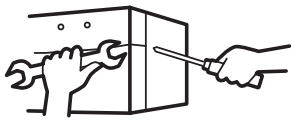
●加工しない ●束ねない ●ねじらない
●折らない ●物をのせない ●加熱しない
●無理に曲げない

破損して火災・感電の原因になります。

禁 止

修理・分解・改造はしない

火災・感電の原因になります。



根元まで差込む

電源プラグのほこりを取り除き、刃の根元まで確実に差込む

接続が不十分だと、隙間にほこりが付着して火災・感電の原因になります。

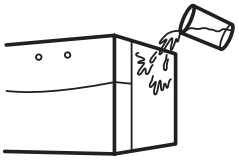
指定の規格

取扱説明書に指定された規格のコンセントを使用する

指定された規格以外で使用すると火災・感電の原因になります。

禁 止

本体を水につけたり、水をかけたりしない



ショート・感電の原因になります。

禁 止

電源コードや電源プラグが傷んだり、コンセントの差し込みがゆるいときは使わない

感電・ショート・発火の原因になります。

禁 止

使用時や使用直後（運転停止後約60分間）は、操作に関係のない部位には触れない

高温部に触れ、やけどの原因になります。

プラグを抜く

異常時は、運転を停止して電源プラグを抜く

異常のまま運転を続けると火災・感電の原因になります。

禁 止

同梱の電源コード・電源プラグ以外のコード・プラグを使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

禁 止

同梱の電源コード・電源プラグを他の電気機器に使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

⚠ 注意

禁 止

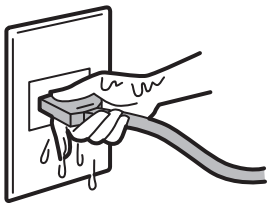
設置時は、次のような場所には置かない

●不安定な場所　●湿気やほこりの多い場所
●油煙や湯気が当たる場所
●直射日光の当たる場所　●風雨のあたる場所
●熱器具の近く　●高温になる場所
●吸・排気口をふさぐような場所

このような場所に置くと、ショートや発熱、電源コードの被膜が溶けるなどして、火災や感電、故障、変形の原因になることがあります。

禁 止

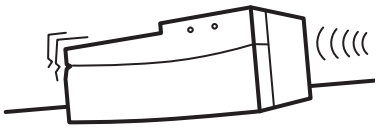
ぬれた手で電源プラグを抜き差しをしない



感電の原因になります。

水平

水平で丈夫な場所に設置する



プラグを持つ

電源プラグを持ってまっすぐ引き抜く

ななめに引き抜いたり、コードを持って抜くと、プラグの刃や芯線が破損してショート・感電・発火の原因になります。

⚠ 低温室で使用する場合の注意

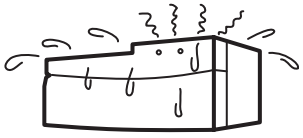
電源を
入れておく

装置を低温環境下でご使用になる場合、システム電源は常時入れておく

低温環境下で長時間システムの電源を落とした状態で放置すると、結露などにより故障の原因になります。
ランプなどの消耗品は OFF にしておくと、劣化を防ぐことができます。

電源を
入れない

装置を低温室から常温の場所に移動させる場合、常温に設置後、装置内の結露が無くなるまでシステム電源を入れない（状況により異なるが、通常半日から一昼夜）



感電・漏電火災の原因になります。

弊社製品についてのお問合せ　（バイオダイレクトライン）

TEL：03-5331-9336

受付時間 9：00 ～ 17：30
土・日・祝日、弊社指定休業日、年末年始を除く

www.gelifesciences.co.jp

e-mailで最新情報をお届けしています。お申込みは上記Webサイト右上の「メール会員登録」から。

©2009 GE ヘルスケア・ジャパン株式会社 本書の全部または一部を無断で複写複製することは、著作権法上の例外を除き、禁じられています。
掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。
掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。

GEヘルスケア・ジャパン株式会社
ライフサイエンス統括本部
〒169-0073
東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング
お問合せ：バイオダイレクトライン
TEL : 03-5331-9336　FAX : 03-5331-9370
e-mail : Tech-JP@ge.com

ISO 9001:2000認証取得

取扱店